

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

**PCT**

## **NOTIFICATION D'ELECTION**

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 01 mai 2000 (01.05.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/02329	Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13117.3 EE
Date du dépôt international (jour/mois/année) 30 septembre 1999 (30.09.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 02 octobre 1998 (02.10.98)
Déposant SANSON, Alain etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:  
28 mars 2000 (28.03.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite  
☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

<p>Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse</p> <p>no de télécopieur: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p>R. Forax</p> <p>no de téléphone: (41-22) 338.83.38</p>
---	---

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

**Translation**

**PATENT COOPERATION TREATY**

**PCT**

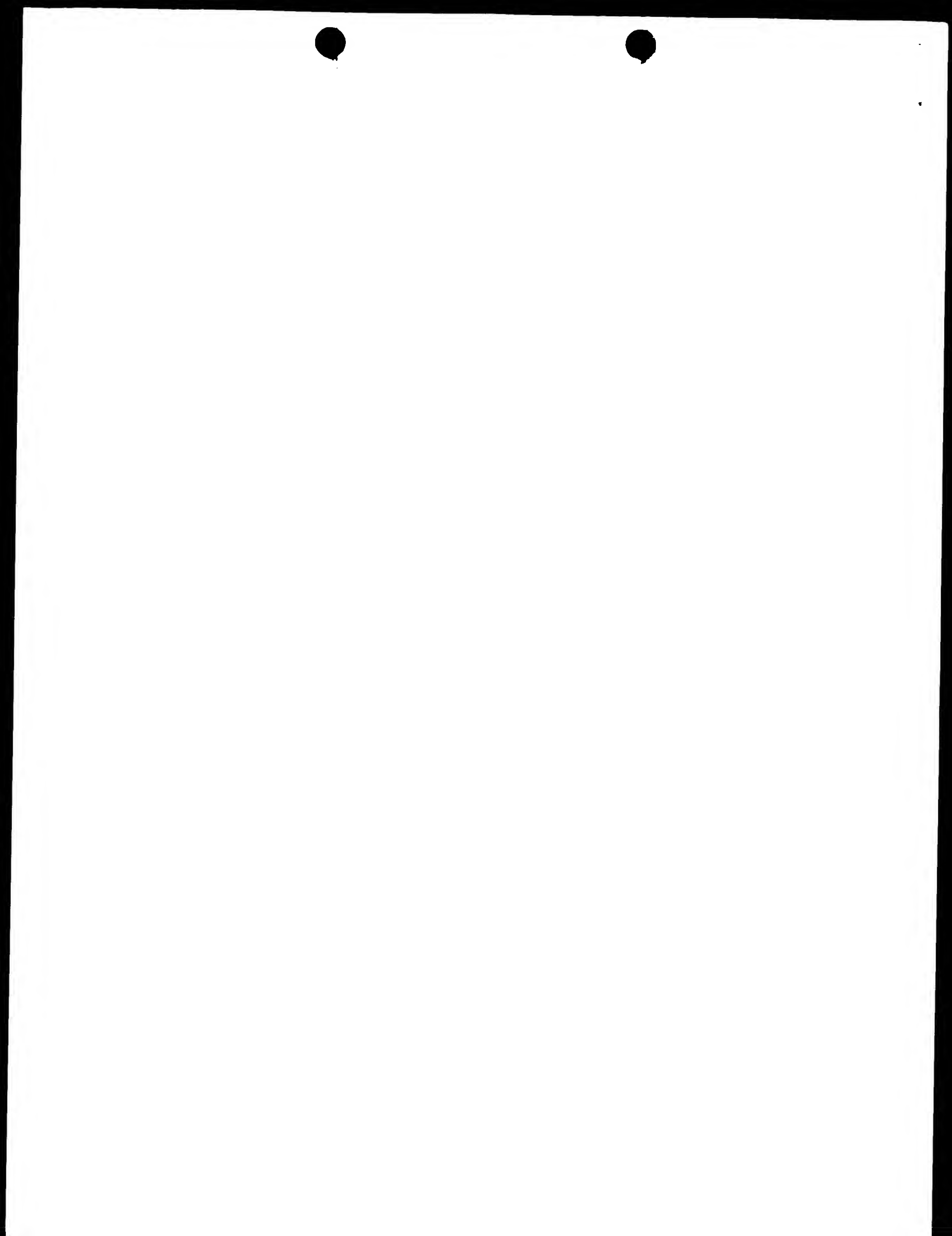
**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference B 13117.3 EE	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPC-A 416)	
International application No. PCT/FR99/02329	International filing date ( <i>day month year</i> ) 30 September 1999 (30.09.99)	Priority date ( <i>day month year</i> ) 02 October 1998 (02.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14 47		
Applicant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>16</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 28 March 2000 (28.03.00)	Date of completion of this report 19 December 2000 (19.12.2000)
Name and mailing address of the IPEA EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02329

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to a demand under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments)*

☐ the international application as originally filed.

☒ the description. pages 1-12, 15-40 . as originally filed.

pages \_\_\_\_\_ . filed with the demand.

pages 13, 14 . filed with the letter of 27 November 2000 (27.11.2000)

pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_

☒ the claims. Nos. \_\_\_\_\_ . as originally filed.

Nos. \_\_\_\_\_ . as amended under Article 19.

Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the demand.

Nos. 1-39 . filed with the letter of 27 November 2000 (27.11.2000)

Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_

☒ the drawings. sheets fig 1 10-10 10 . as originally filed.

sheets fig \_\_\_\_\_ . filed with the demand.

sheets fig \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_

sheets fig \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. The amendments have resulted in the cancellation of

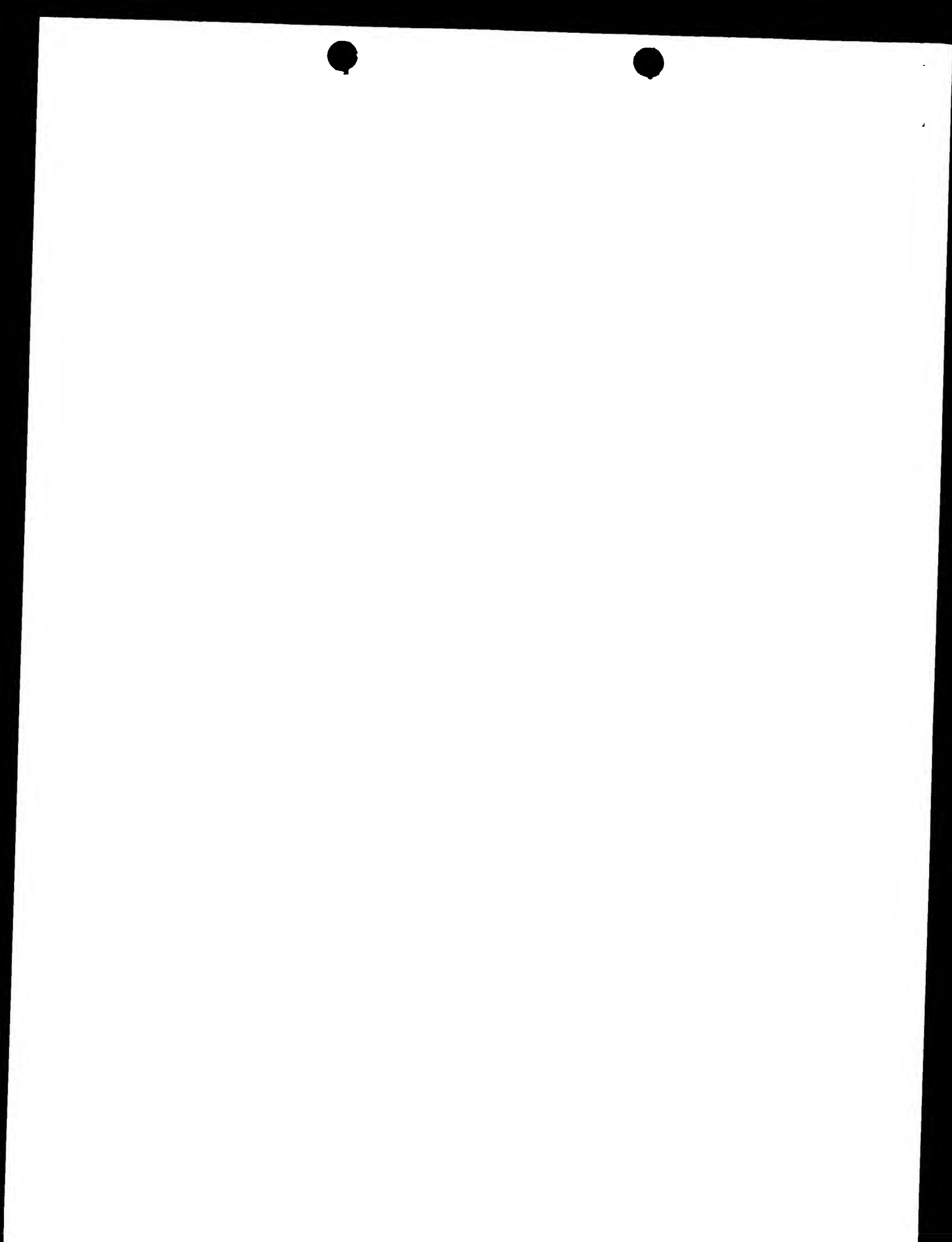
☐ the description. pages \_\_\_\_\_

☐ the claims. Nos. \_\_\_\_\_

☐ the drawings. sheets fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c))

4. Additional observations, if necessary:



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02329

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16, 18	YES
	Claims	17, 19-39	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-39	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-39	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### 1. Reference is made to the following documents:

D1: J. Mol. Biol., Vol. 279, pages 1163-1175, 1998

D2: WO 92/19279

D3: US-A-5 627 036

#### 2. D1 mentions various domains of human annexin I, particularly domains D1 and D2, and the individual expression of said domains in E. coli. D1 describes methods for the expression, isolation and purification of the D2 domain as well as, in particular, NMR experiments after radiolabelling of the D2 domain and solubilisation in a micelle solution (the abstract; page 1165, column 1; page 1168, column 2, paragraph 3; page 1172, column 2, last paragraph to page 1173, column 2, last paragraph).

The human annexin I mentioned in D1 matches the human annexin I having SEQ ID NO.: 1 of Figure 6A of the present application. D1 does not mention that the chemical structure it describes has affinity for a phospholipid but, in light of D1, the subject



matter of Claims 17, 19, 20, 23-26, 31 and 33 is nonetheless not novel. Indeed, revealing new properties (for example, phospholipid affinity) of a known substance cannot render said substance novel. It follows that Claims 17, 19, 20, 23-26, 31 and 33 are not novel over D1.

D2 mentions that annexins have the property of calcium-dependent binding to negatively charged phospholipids. In particular, D2 describes human annexin V which, in the presence of calcium, shows very high affinity for phospholipids such as phosphatidylserine (PS), phosphatidylcholine (PC) and phosphatidic acid (page 7, line 17 to page 8, line 15; page 15, line 21; page 17, lines 9-14). D2 describes the production of annexin V by cloning the cDNA thereof into an expression vector (page 17, line 23 to page 18, line 7). D2 mentions the use of annexin V to target thrombosis *in vivo* as well as the radiolabelling or fluorescent labelling of annexin (page 21, lines 7-17; page 15, lines 22-27). D2 describes a chemical structure including a annexin V having affinity for phospholipids conjugated to a thrombolytic agent. This structure is produced by means of cloning and expression in *E. coli* (page 1, lines 7-9; page 10, lines 15-20; page 21, lines 20-25; Examples II and III; Claims 1-3; Claim 31). D2 also mentions the use of this chemical structure in therapeutic compositions and in accordance with therapeutic methods in order to treat diseases caused by thrombosis (page 10, lines 21-25; Claims 8-10). D2 describes a peptide sequence present in the various domains of annexin V as well as in other proteins having a calcium-dependent affinity for phospholipids. D2 suggests



that this sequence contains a calcium site and is responsible for phospholipid binding (page 18, line 15 to page 19, line 3).

The human annexin V of D2 corresponds to the annexin having SEQ ID NO.: 2 of Figure 6B of the present application. It follows that the annexin V described in D2 corresponds to a chemical structure, as defined in Claims 17, 19 and 20. Annexin V consists of domains D1 to D5, each of which is known for its ability to bind to membrane phospholipids and to calcium. Annexin V therefore also corresponds to a chemical assembly, as defined in Claims 23 and 24.

As a result, Claims 17 and 19-33 are not novel over D2.

D3 describes human annexins, including annexin I (lipocortin I) and annexin V (PAP-I), the labelling of said annexins using a fluorescent molecule, a paramagnetic compound or a radioisotope, and the use thereof to distinguish between phosphatidylserine and phosphatidylcholine (the abstract: column 2, lines 6-18 and 56-59). D3 also mentions an assay and detection kit containing said labelled annexins that are capable of distinguishing between phosphatidylserine and phosphatidylcholine. Said kit can be used, in particular, for detecting microvesicles in blood (column 2, lines 50-55; column 6, lines 43-59; Claim 27).

As a result, Claims 17, 19-24 and 31-39 are not novel over D3.



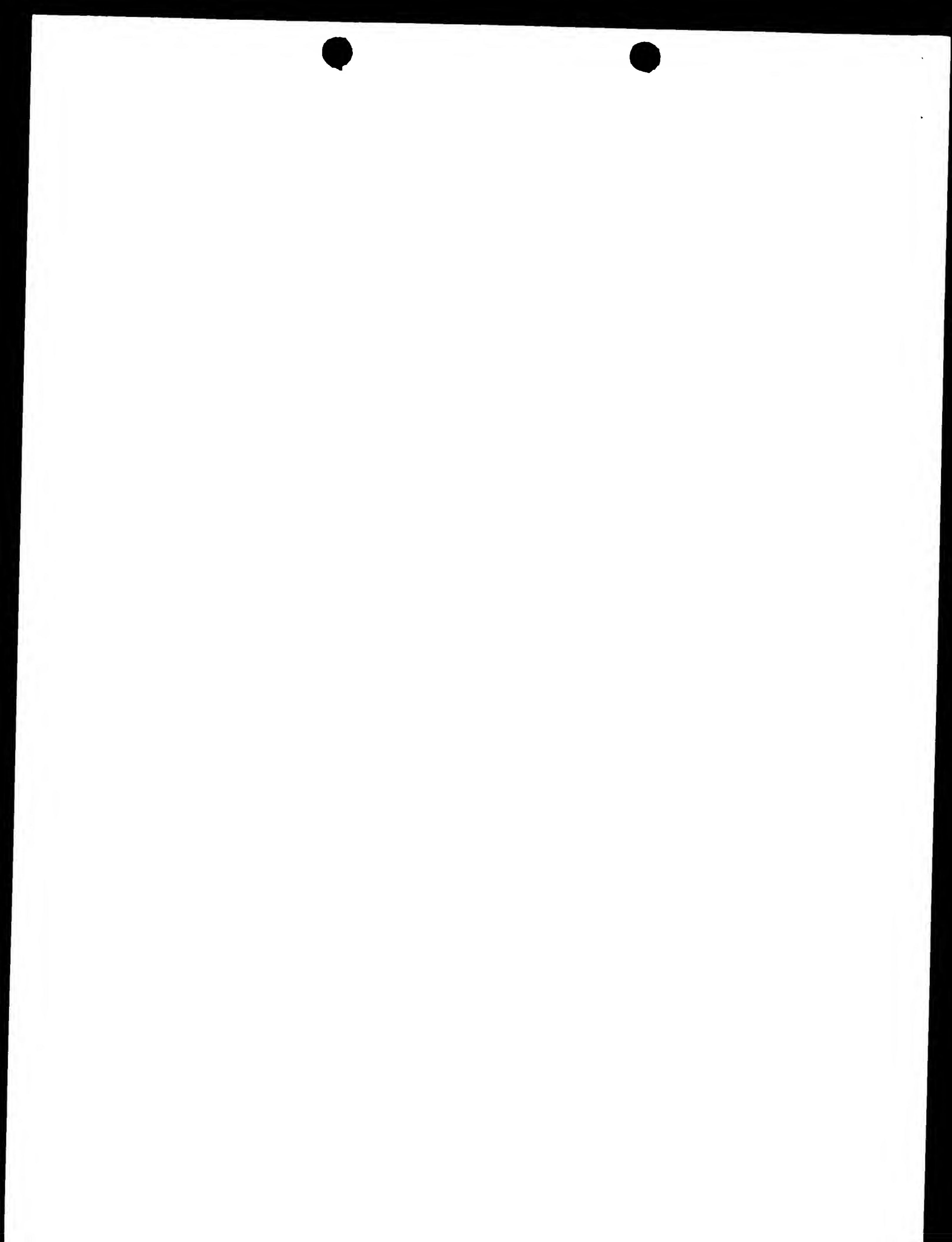


It follows that Claims 17 and 19-39 do not fulfil the requirements of PCT Article 33(2).

3. The subject matter of Claims 13-16 differs from that of D2 in that, in D2, the region of the annexin molecule having a calcium site and affinity for a phospholipid is merely suggested. Since the region of the annexins having a calcium site and affinity for a phospholipid is suggested in D2, a person skilled in the art would not have to exercise any inventive skill in order to verify the involvement of said region in phospholipid binding or the presence of a calcium site. By simply using knowledge and techniques known in the prior art such as, for example, the point mutation of amino acids, it is possible to identify the amino acids that bind to a phospholipid as well as those present at the calcium site. A person skilled in the art would therefore not have to exercise any inventive skill in order to arrive at the subject matter of Claims 13-16. Said claims are not inventive.

The subject matter of Claims 1-12 and 18 differs from D2 in that the chemical structure claimed is cyclic. The cyclisation of peptides having an active site in order to impart greater stability thereto is well known to a person skilled in the art and routinely practiced. A person skilled in the art would therefore not have to exercise any inventive skill in order to arrive also at the subject matter of Claims 1-12 and 18. It follows that these claims are not inventive.

Claims 1-16 and 18 therefore do not fulfil the requirements of PCT Article 33(3).



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

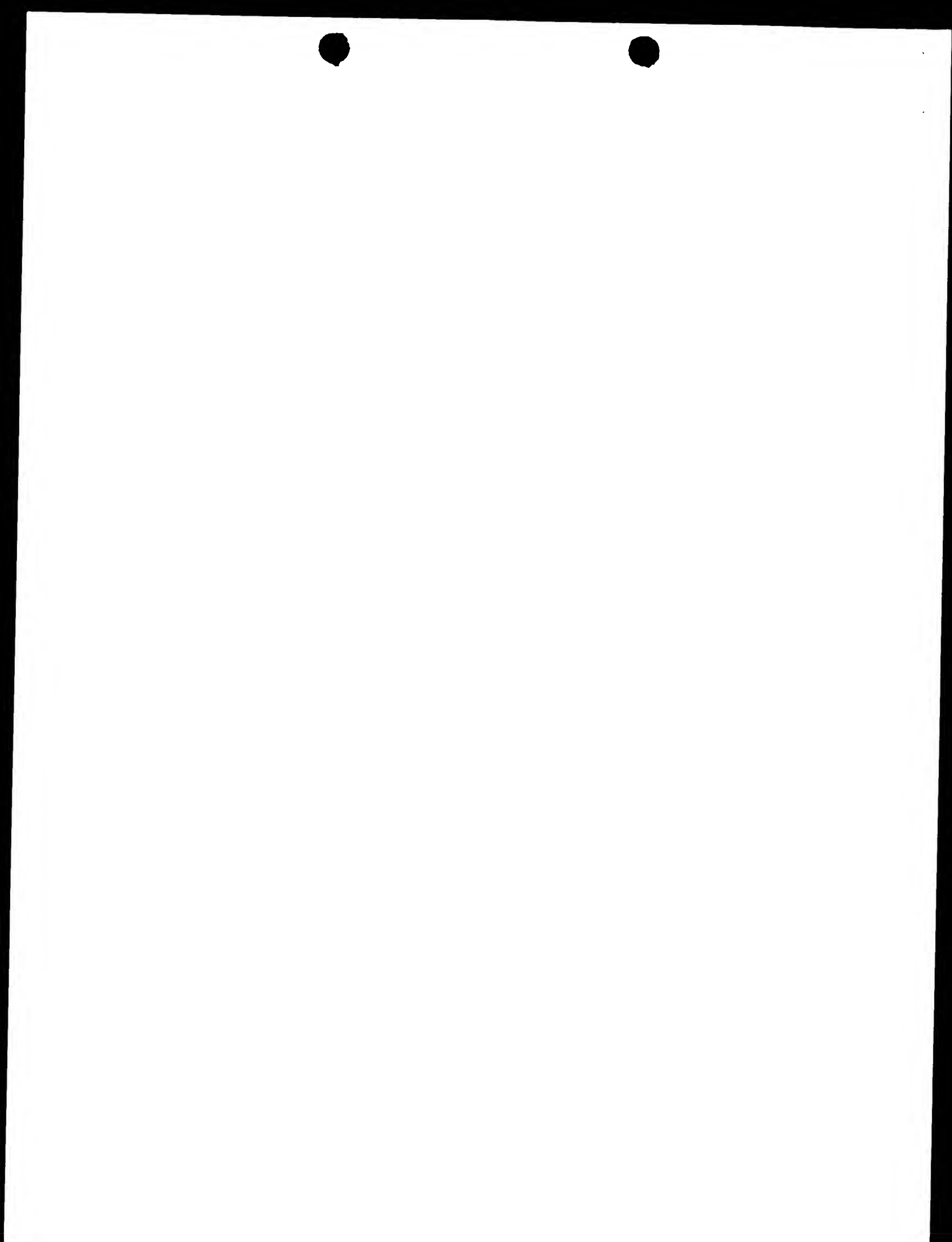
International application No.

PCT/FR 99/02329

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

A typing error has rendered Claim 22 dependent on  
Claim 22 rather than on Claim 21.



## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. In Claims 1 and 2, the expression "at least one ..." does not clearly define the scope of protection sought (PCT Article 6).
2. Constructions (II) and (III) in Claim 1 lack clarity due to the fact that the spaces between  $W^1$  and  $W^2$ , and  $U^1$  and  $U^2$ , as well as the dotted line between  $U^2$  and  $W^1$  in construction (III), are not defined (PCT Article 6).
3. The subject matter of Claims 1, 2 and 18 is not supported by the description. Indeed, the description contains only statements (page 5, line 31 to page 8, line 17; page 9, line 9 to page 12, line 25; page 17, lines 7-21) and provides no technical basis with respect to cyclic chemical structures, such as those corresponding to constructions (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) and (VIII). The present application describes linear structures but no circular structures of the kind disclosed in Claims 1, 2 and 18 have been produced. In this context, it should be noted that the subject matter for which protection is sought should reflect the real state of the technical contribution of the application. Moreover, the present application makes no reference to the spacing between the binding chemical functions, L1 to L6. As a result, Claims 1, 2 and 18 are not supported by the description (PCT Article 6 - support; see also the PCT Guidelines C-III, 6.3).



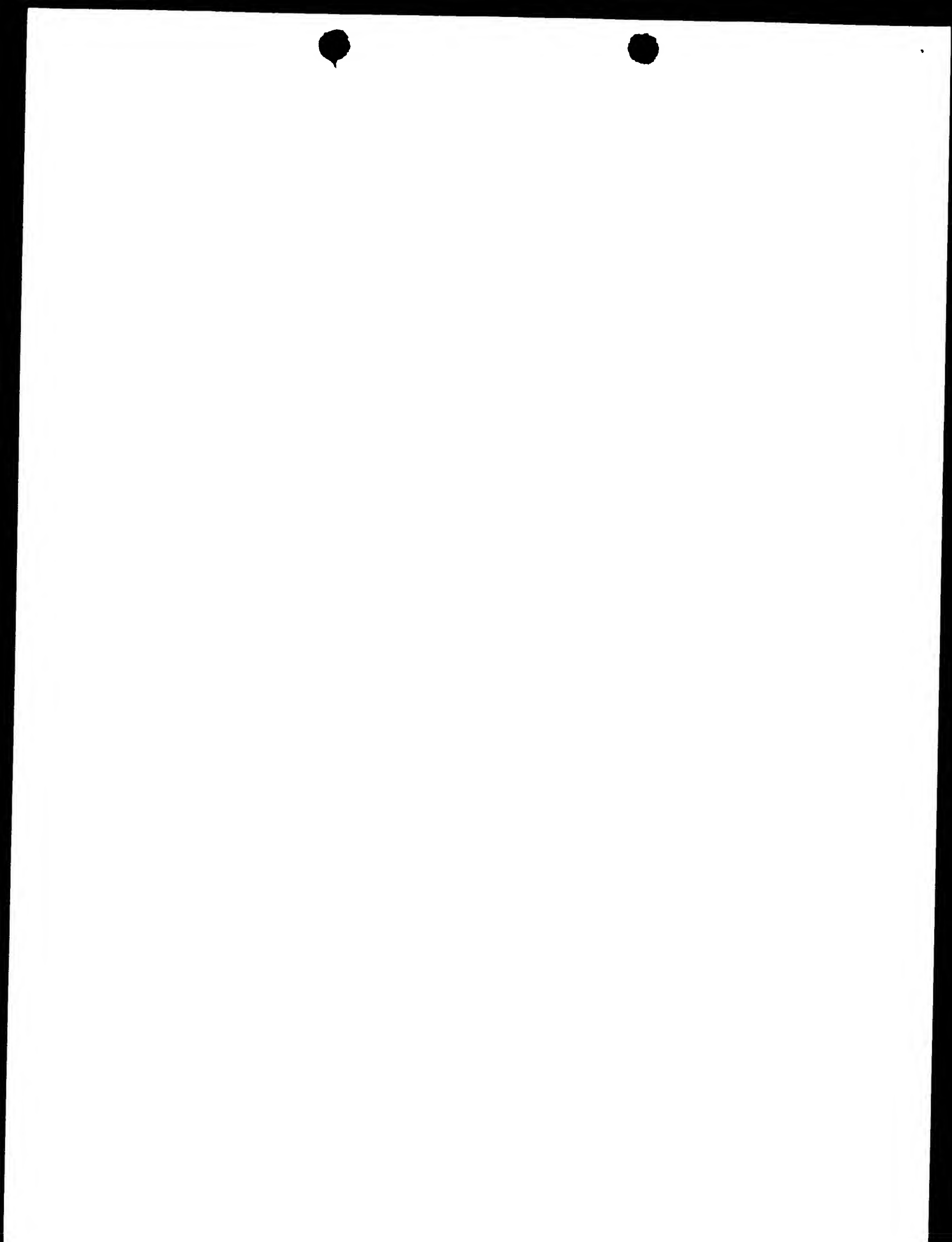
# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02329

## VIII. Certain observations on the international application

4. Claim 17 is unclear owing to the formulation "it includes at least one portion ...". Indeed, this vague and unclear formulation does not refer to any technical features and, as such, is open to interpretation. Said formulation does not make it possible to define clearly the scope of protection sought (PCT Article 6).





## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

NOTIFICATION RELATIVE  
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Destinataire:

DES TERMES, Monique  
Brevatome  
3, rue du Docteur Lancereaux  
F-75008 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 18 octobre 1999 (18.10.99)	<b>NOTIFICATION IMPORTANTE</b>
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13117.3 EE	
Demande internationale no PCT/FR99/02329	
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	
Date du dépôt international (jour/mois/année) 30 septembre 1999 (30.09.99)	
Date de priorité (jour/mois/année) 02 octobre 1998 (02.10.98)	
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE etc	

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un **astérisque(\*)** figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
02 octo 1998 (02.10.98)	98/12366	FR	11 octo 1999 (11.10.99)

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Jocelyne Rey-Millet

no de téléphone (41-22) 338.83.38



# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>B 13117.3 EE</b>	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 99/ 02329</b>	Date du dépôt international (jour, mois, année) <b>30/09/1999</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour, mois, année) <b>02/10/1998</b>
Déposant <b>COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

#### 1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
  - ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
  - ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
  - ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
  - ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
  - ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☒ **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).
3. ☐ **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

#### 4. En ce qui concerne le **titre**,

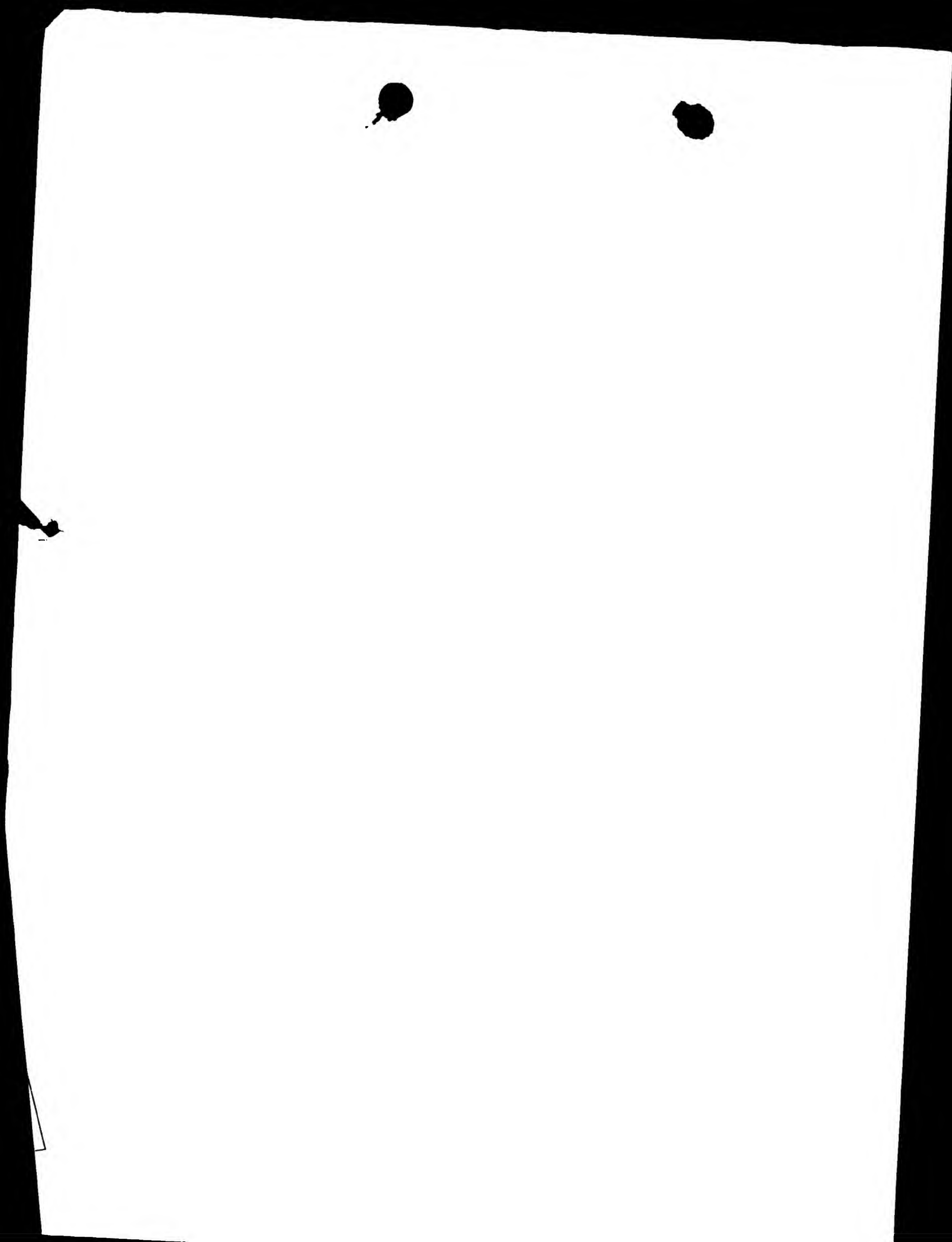
- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

#### 5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

#### 6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☒ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.
7. ☐ Aucune des figures n'est à publier.



Translation of Category of Cited Documents in the attached foreign language Search Report:

- X: particularly relevant if taken alone
  - Y: particularly relevant if combined with another document of the same category
  - A: relevant to at least one claim or as technological background
  - O: non-written disclosure
  - P: intermediate document
  - T: theory or principle underlying the invention
  - E: document entitled to a date prior to the filing date but which was not published until the filing date or a later date
  - D: document cited in the application
  - L: document cited for other reasons
- 
- &: member of the same patent family, corresponding document



RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
nationalFA 565660  
FR 9812366

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
1) X	F. CORDIER-OCHSENBEIN ET AL.: "Exploring the folding pathways of annexin I, a multidomain protein. I." J. MOL. BIOL., vol. 279, juin 1998, pages 1163-1175, XP002107103 * page 1173, alinéa 1 *	1-19,21, 22,25-28
2) X	K. SANO ET AL.: "Isolation and sequence of a c-DNA clone for the rat pulmonary surfactant-associated protein (PSP-A)" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 144, no. 1, 1987, pages 367-374, XP002107104 ORLANDO, FL US Seq 27-74 * page 368, ligne 1; figures 2,3 *	1-10,22, 29
3) X	F. MACQUAIRE ET AL: "Proton NMR Conformational study of an annexin I fragment" BIOCHEMISTRY, vol. 32, 1993, pages 7244-7254, XP002107105 * abrégé * * page 7244 *	1-13,19, 21,22
4) X	WO 91 09953 A (ZYMOGENETICS INC) ✓ 11 juillet 1991 * page 10 *	1-13,19, 21-30
5) X,D	WO 92 19279 A (UNIV WASHINGTON) ✓ 12 novembre 1992 * page 8 * * page 18 - page 19 *	1-13,19, 21-32
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
24 juin 1999		Cervigni, S
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		





RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
nationalFA 565660  
FR 9812366

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée				
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes					
X	J.D. ERNST ET AL: "Annexins possess functionality distinguishable Ca <sup>2+</sup> and phospholipid binding domains" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 200, no. 2, 1994, pages 867-876, XP002107106 ORLANDO, FL US * page 867 - page 868; figure 1 *	1-19, 21-28				
X	US 5 627 036 A (REUTELINGSPERGER CHRISTIAAN) 6 mai 1997  * abrégé; revendications *	1-13, 19, 21-24, 33-41				
A	R. HUBER ET AL: "The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 A resolution" FEBS LETTER, vol. 275, no. 1,2, 1990, pages 15-21, XP002107107 * page 17, colonne 2 * * page 18, colonne 2, dernière ligne *					
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)				
Date d'achèvement de la recherche		Examineur				
24 juin 1999		Cervigni, S				
<table><tr><td>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</td><td>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</td></tr><tr><td>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</td><td></td></tr></table>			CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant					
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire						



**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO.**

FA 565660  
FR 9812366

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets,  
ni de l'Administration française

24-06-1999

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9109953 A	11-07-1991	US 5225537 A AU 7030691 A	06-07-1993 24-07-1991
WO 9219279 A	12-11-1992	CA 2086437 A EP 0538459 A US 5632986 A	10-11-1992 28-04-1993 27-05-1997
US 5627036 A	06-05-1997	AT 164083 T AU 642202 B AU 7071191 A CA 2070647 A DE 4040817 A DE 59010815 D WO 9109628 A EP 0509026 A EP 0806670 A ES 2113372 T HU 209650 B NO 305276 B NZ 236620 A PT 96385 A, B	15-04-1998 14-10-1993 24-07-1991 28-06-1991 04-07-1991 23-04-1998 11-07-1991 21-10-1992 12-11-1997 01-05-1998 28-09-1994 03-05-1999 24-03-1997 31-10-1991



**Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants.

1. ☒ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
Remarque: Bien que les revendications 29-31 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.
2. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>.
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>.

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 99/02329

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 ~ C07K14/47 A61K38/17 G01N33/58 G01N33/86

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K A61K G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	F. CORDIER-OCHSENBEIN ET AL.: "Exploring the folding pathways of annexin I, a multidomain protein. I." J. MOL. BIOL., vol. 279, juin 1998 (1998-06), pages 1163-1175, XP002107103 page 1173, alinéa 1 ---	1-19, 21, 22, 25-28
X	K. SANO ET AL.: "Isolation and sequence of a c-DNA clone for the rat pulmonary surfactant-associated protein (PSP-A)" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 144, no. 1, 1987, pages 367-374, XP002107104 ORLANDO, FL US Seq 27-74 page 368, ligne 1; figures 2, 3 --- -/-	1-10, 22, 29



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent  
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date  
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)  
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens  
"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 janvier 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/01/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cervigni, S



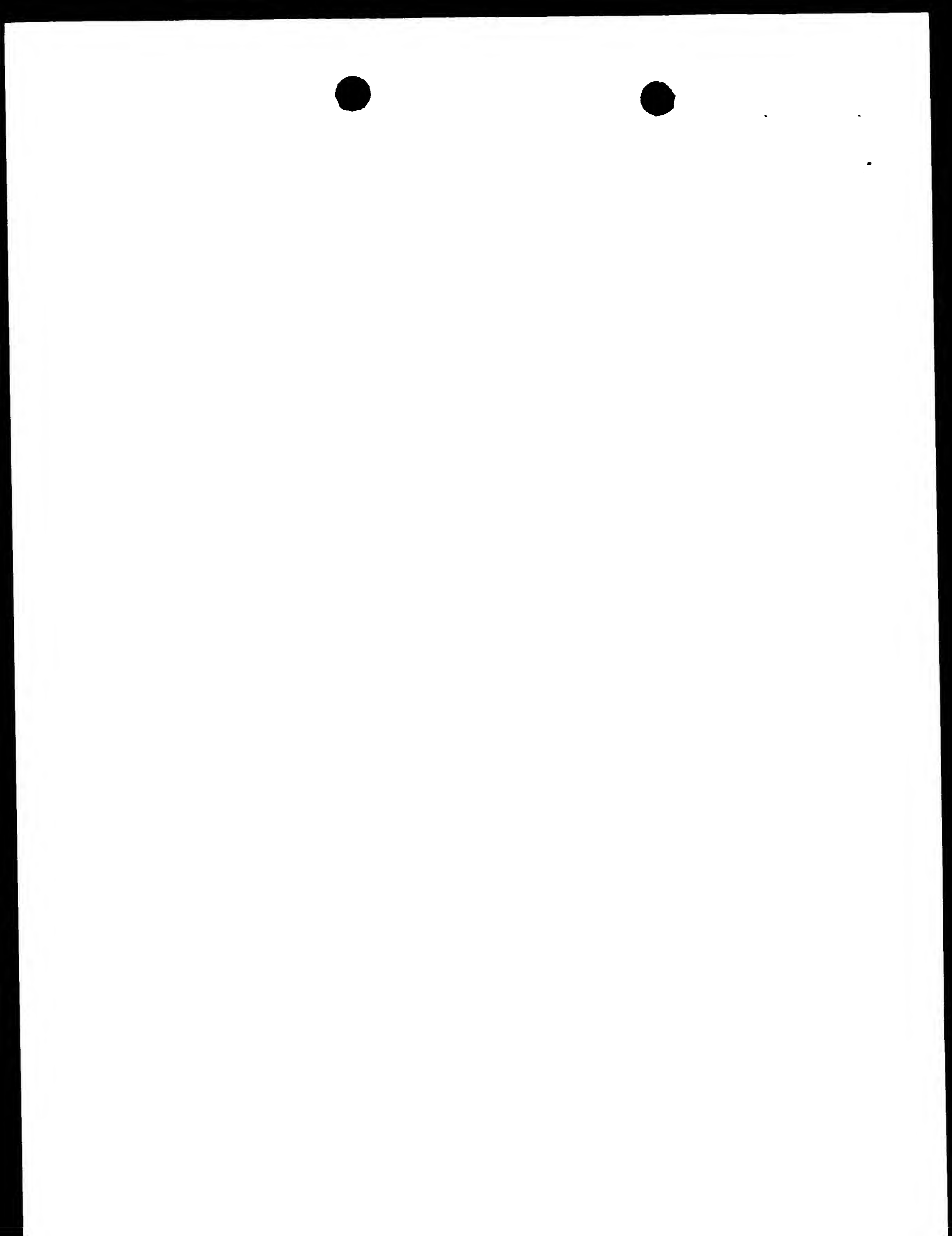


## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 99/02329

C.(suite) DOCUMENTS CONSULTÉS COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	F. MACQUAIRE ET AL: "Proton NMR Conformational study of an annexin I fragment" BIOCHEMISTRY, vol. 32, 1993, pages 7244-7254, XP002107105 abrégé page 7244 ---	1-13,19, 21,22
X	WO 91 09953 A (ZYMOGENETICS INC) 11 juillet 1991 (1991-07-11) page 10 ---	1-13,19, 21-30
X	WO 92 19279 A (UNIV WASHINGTON) 12 novembre 1992 (1992-11-12) cité dans la demande page 8 page 18 -page 19 ---	1-13,19, 21-32
X	J.D. ERNST ET AL: "Annexins possess functionality distinguishable Ca <sup>2+</sup> and phospholipid binding domains" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 200, no. 2, 1994, pages 867-876, XP002107106 ORLANDO, FL US page 867 -page 868; figure 1 ---	1-19, 21-28
X	US 5 627 036 A (REUTELINGSPERGER CHRISTIAAN) 6 mai 1997 (1997-05-06)  abrégé; revendications ---	1-13,19, 21-24, 33-41
A	R. HUBER ET AL: "The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution" FEBS LETTER, vol. 275, no. 1,2, 1990, pages 15-21, XP002107107 page 17, colonne 2 page 18, colonne 2, dernière ligne -----	



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 99/02329

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9109953 A	11-07-1991	US 5225537 A	06-07-1993
		AU 7030691 A	24-07-1991
WO 9219279 A	12-11-1992	CA 2086437 A	10-11-1992
		EP 0538459 A	28-04-1993
		US 5632986 A	27-05-1997
US 5627036 A	06-05-1997	US 5955437 A	21-09-1999
		AT 164083 T	15-04-1998
		AU 642202 B	14-10-1993
		AU 7071191 A	24-07-1991
		CA 2070647 A	28-06-1991
		DE 4040817 A	04-07-1991
		DE 59010815 D	23-04-1998
		WO 9109628 A	11-07-1991
		EP 0509026 A	21-10-1992
		EP 0806670 A	12-11-1997
		ES 2113372 T	01-05-1998
		HU 209650 B	28-09-1994
		NO 305276 B	03-05-1999
		NZ 236620 A	24-03-1997
		PT 96385 A, B	31-10-1991



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02329

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/47 A61K38/17 G01N33/58 G01N33/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	F. CORDIER-OCHSENBEIN ET AL.: "Exploring the folding pathways of annexin I, a multidomain protein. I." J. MOL. BIOL., vol. 279, June 1998 (1998-06), pages 1163-1175, XP002107103 page 1173, paragraph 1 ---	1-19, 21, 22, 25-28
X	K. SANO ET AL.: "Isolation and sequence of a c-DNA clone for the rat pulmonary surfactant-associated protein (PSP-A)" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 144, no. 1, 1987, pages 367-374, XP002107104 ORLANDO, FL US Seq 27-74 page 368, line 1; figures 2, 3 --- -/--	1-10, 22, 29



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 2000

Date of mailing of the international search report

20/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cervigni, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02329

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No
X	F. MACQUAIRE ET AL: "Proton NMR Conformational study of an annexin I fragment" BIOCHEMISTRY, vol. 32, 1993, pages 7244-7254, XP002107105 abstract page 7244 ---	1-13,19, 21,22
X	WO 91 09953 A (ZYMOMENETICS INC) 11 July 1991 (1991-07-11) page 10 ---	1-13,19, 21-30
X	WO 92 19279 A (UNIV WASHINGTON) 12 November 1992 (1992-11-12) cited in the application page 8 page 18 -page 19 ---	1-13,19, 21-32
X	J.D. ERNST ET AL: "Annexins possess functionality distinguishable Ca <sup>2+</sup> and phospholipid binding domains" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 200, no. 2, 1994, pages 867-876, XP002107106 ORLANDO, FL US page 867 -page 868; figure 1 ---	1-19, 21-28
X	US 5 627 036 A (REUTELINGSPERGER CHRISTIAAN) 6 May 1997 (1997-05-06)  abstract; claims ---	1-13,19, 21-24, 33-41
A	R. HUBER ET AL: "The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 A resolution" FEBS LETTER, vol. 275, no. 1,2, 1990, pages 15-21, XP002107107 page 17, column 2 page 18, column 2, last line -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR 99/02329

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Observation: Although Claims 29-31 concern a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out on the basis of the effects attributed to the product/composition.**
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6 4(a)

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 99/02329

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9109953 A	11-07-1991	US 5225537 A	06-07-1993
		AU 7030691 A	24-07-1991
WO 9219279 A	12-11-1992	CA 2086437 A	10-11-1992
		EP 0538459 A	28-04-1993
		US 5632986 A	27-05-1997
US 5627036 A	06-05-1997	US 5955437 A	21-09-1999
		AT 164083 T	15-04-1998
		AU 642202 B	14-10-1993
		AU 7071191 A	24-07-1991
		CA 2070647 A	28-06-1991
		DE 4040817 A	04-07-1991
		DE 59010815 D	23-04-1998
		WO 9109628 A	11-07-1991
		EP 0509026 A	21-10-1992
		EP 0806670 A	12-11-1997
		ES 2113372 T	01-05-1998
		HU 209650 B	28-09-1994
		NO 305276 B	03-05-1999
		NZ 236620 A	24-03-1997
		PT 96385 A,B	31-10-1991



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02329

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9109953	A	11-07-1991	US 5225537 A	06-07-1993
			AU 7030691 A	24-07-1991
WO 9219279	A	12-11-1992	CA 2086437 A	10-11-1992
			EP 0538459 A	28-04-1993
			US 5632986 A	27-05-1997
US 5627036	A	06-05-1997	US 5955437 A	21-09-1999
			AT 164083 T	15-04-1998
			AU 642202 B	14-10-1993
			AU 7071191 A	24-07-1991
			CA 2070647 A	28-06-1991
			DE 4040817 A	04-07-1991
			DE 59010815 D	23-04-1998
			WO 9109628 A	11-07-1991
			EP 0509026 A	21-10-1992
			EP 0806670 A	12-11-1997
			ES 2113372 T	01-05-1998
			HU 209650 B	28-09-1994
			NO 305276 B	03-05-1999
			NZ 236620 A	24-03-1997
			PT 96385 A,B	31-10-1991



to provide stiffness compatible with the affinity towards the phospholipid.

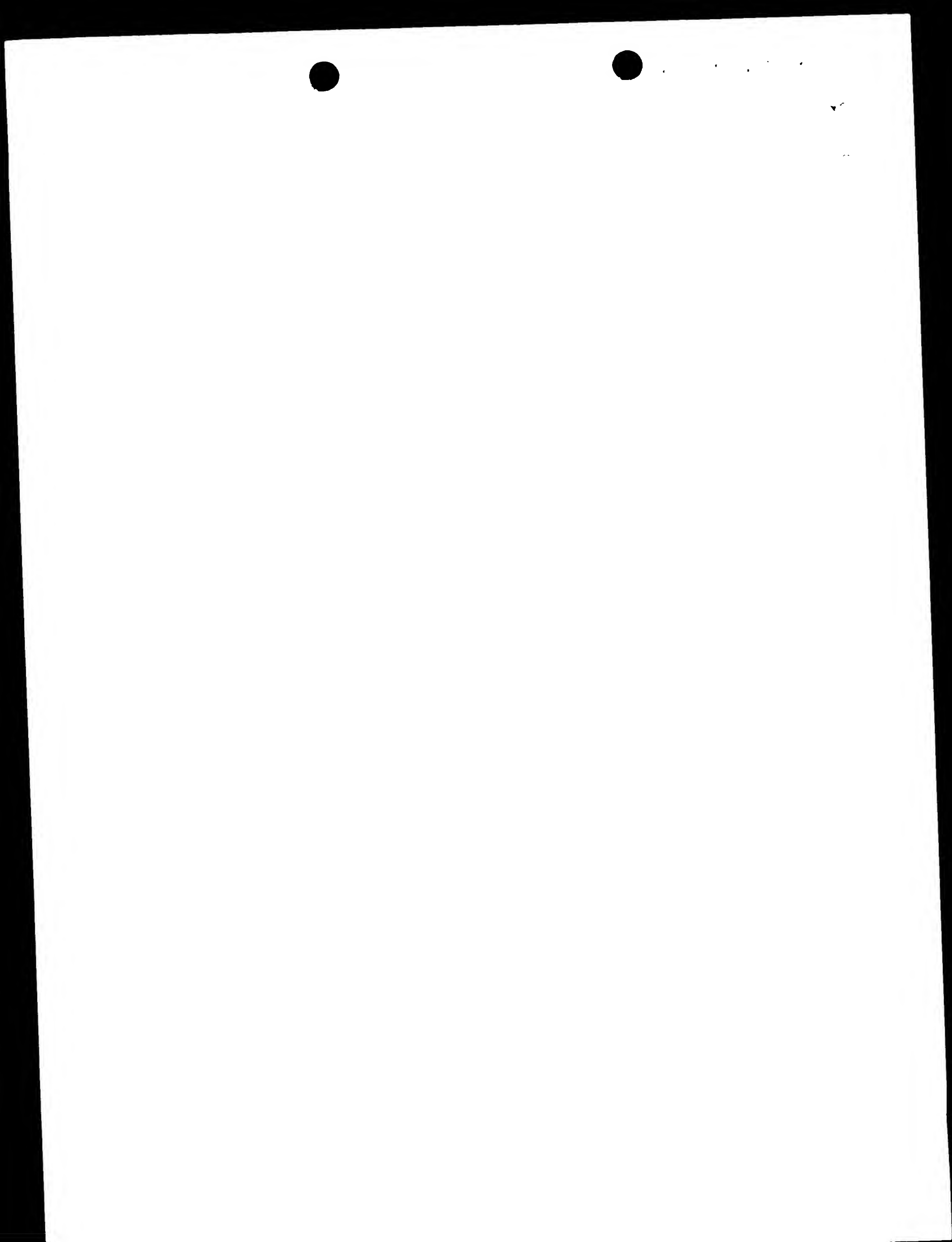
The measured distances when RLs and RCas are amino acids, may be measured between the  $\alpha$  carbon atoms of these amino acids in the aforementioned structures (I) to (VI).

These structures may be synthesized by conventional synthesis methods of organic chemistry and of protein chemistry, by genetic recombination, by genetic engineering, etc.

Examples of such structures are notably given in "Discovery of Sequence-Selective Peptide Binding by Synthetic Receptors Using Encoded Combinatorial Libraries", W.C. Still, Acc. Chem. Res., 1996, 29, 155-163 and in "Toward Synthetic Adrenaline Receptors: Strong, Selective and Biomimetic Recognition of Biologically Active Amino Alcohols by Bisphosphonate Receptors Molecules", T. Shrader, J. Org. Chem., 1998, 63, 264-272.

According to the invention, in the structure of construction (IV), (V) or (VI), L1, L2, L3 and L6 may each have at least a positively charged donor of a hydrogen bond, and L4, L5, LCa5, LCa4, LCa3, LCa2 and LCa1 may each have at least a negatively charged acceptor of a hydrogen bond.

According to the invention, in the structure of construction (I), (II), (III), (IV), (V) or (VI), RL1, RL2, RL3 and RL6 may be independently selected from Arg, Lys, Orn; RL4 may be independently selected from Asp or Glu; and RL5 may be independently selected from



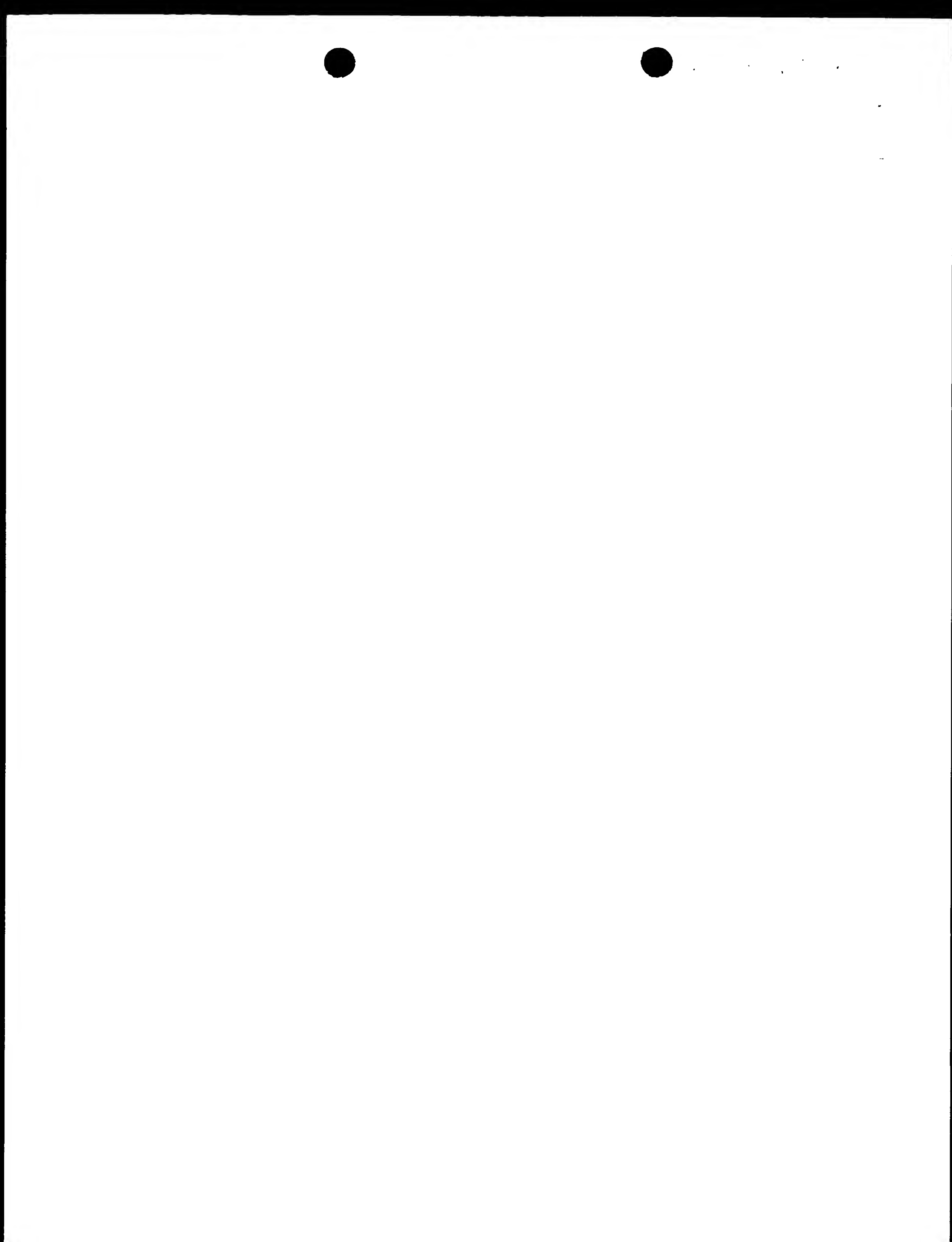
Ser, Thr, Asp or Glu, whereby the side chains of these amino acids have chemical functions for binding to the phospholipids L1 to L6, respectively.

According to the invention, in the structure of construction (IV), (V) or (VI), a or a', b or b', c, d, e, f, g, h, i, j, k may be peptides consisting of natural or non-natural amino acids, and RL1 to RL6 may be amino acids selected from a set comprising Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp and Glu, or analogs of the latter, L1 to L6 and LCa1 to LCa5 may be the charge-bearing functions of the side chains of said amino acids, and RCa1 to RCa5 may be natural or non-natural amino acids.

According to the invention, in the structure of constructions (IV), (V) or (VI), the carbon atoms RL1 to RL6 and RCa1 to RCa2 may be positioned in the space formed by a, b, c, d, e, f, g, h, i, j and k so that the chemical binding functions L1 to L6 respectively and the positive charges of the calcium atom when the latter is bound to the bond functions LCa1 to LCa5, are directly accessible to the phospholipid.

According to the invention, in the structure of construction (I), (II), (III), (IV), (V) or (VI), at least a portion of the platform may be a portion of a domain of the annexin or of a modified domain of the annexin, comprising at least one of said residual ligands RL1 to RL6, having said functions L1 to L6 for binding to the phospholipid respectively.

According to the invention, in the structure of construction (I), (II), (III), (IV), (V), or (VI), the platform may be a portion of a domain of the annexin or



CLAIMS

1. A chemical structure with an affinity for a phospholipid, characterized in that it comprises at least a chemical platform U, V, W, X, Y including six residues RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6 supporting a set  
5 of chemical functions which may bind to said phospholipid, called, L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectively, wherein these chemical functions L define at least partly the affinity of said structure for said phospholipid, said structure having one of the  
10 following constructions (I), (II) and (III):

## DESSINS X 3

wherein U, U<sup>1</sup>, U<sup>2</sup>, V, W, W<sup>1</sup>, W<sup>2</sup>, X, Y, Z are  
15 independently a natural or non-natural amino-acid, a peptide consisting of natural or non-natural amino-acids, a carbon chain, or carbon cyclic group(s),

wherein RL1 to RL6 are selected from molecules having the binding chemical functions L1 to L6,  
20 respectively, wherein said chemical functions comprise either at least a positive charge, donor of a hydrogen bond, or at least a negative charge, acceptor of a hydrogen bond, and

wherein U, U<sup>1</sup>, U<sup>2</sup>, V, W, W<sup>1</sup>, W<sup>2</sup>, X, Y, Z are such  
25 that RL6 and RL1 are distant from 0.65 to 0.95 nm, L6 and L1 are distant from 0.65 to 0.9 nm, RL1 and RL2 are distant from 0.45 to 0.65 nm, L1 and L2 are distant from 0.4 to 0.55 nm, RL2 and RL3 are distant from 0.5





to 1.05 nm, L2 and L3 are distant from 0.4 to 0.6 nm, RL3 and RL4 are distant from 0.5 to 0.8 nm, L3 and L4 are distant from 0.35 to 0.5 nm, RL4 and RL5 are distant from 0.45 to 0.75 nm, and L4 and L5 are distant from 0.4 to 0.55 nm, RL5 and RL6 are distant from 0.4 to 1.2 nm, L5 and L6 are distant from 0.4 to 0.6 nm.

2. The chemical structure with an affinity for a phospholipid, characterized in that it comprises at least a chemical platform a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l including 11 residues, LR1, LR2, LR3, LR4, LR5, RL6, RCal, RCa2, RCa3, RCa4 and RCa5 supporting a set of chemical functions which may bind to said phospholipid called L1, L2, L3, L4, L5, L6, respectively, and a set of chemical functions binding to a calcium atom called LCa1, LCa2, LCa3, LCa4, LCa5, respectively, wherein these chemical functions RL1 to RCa5 define at least partly the affinity of said structure for said phospholipid, said structure having one of the following constructions (IV), (V) and (VI):

#### DESSINS X 3

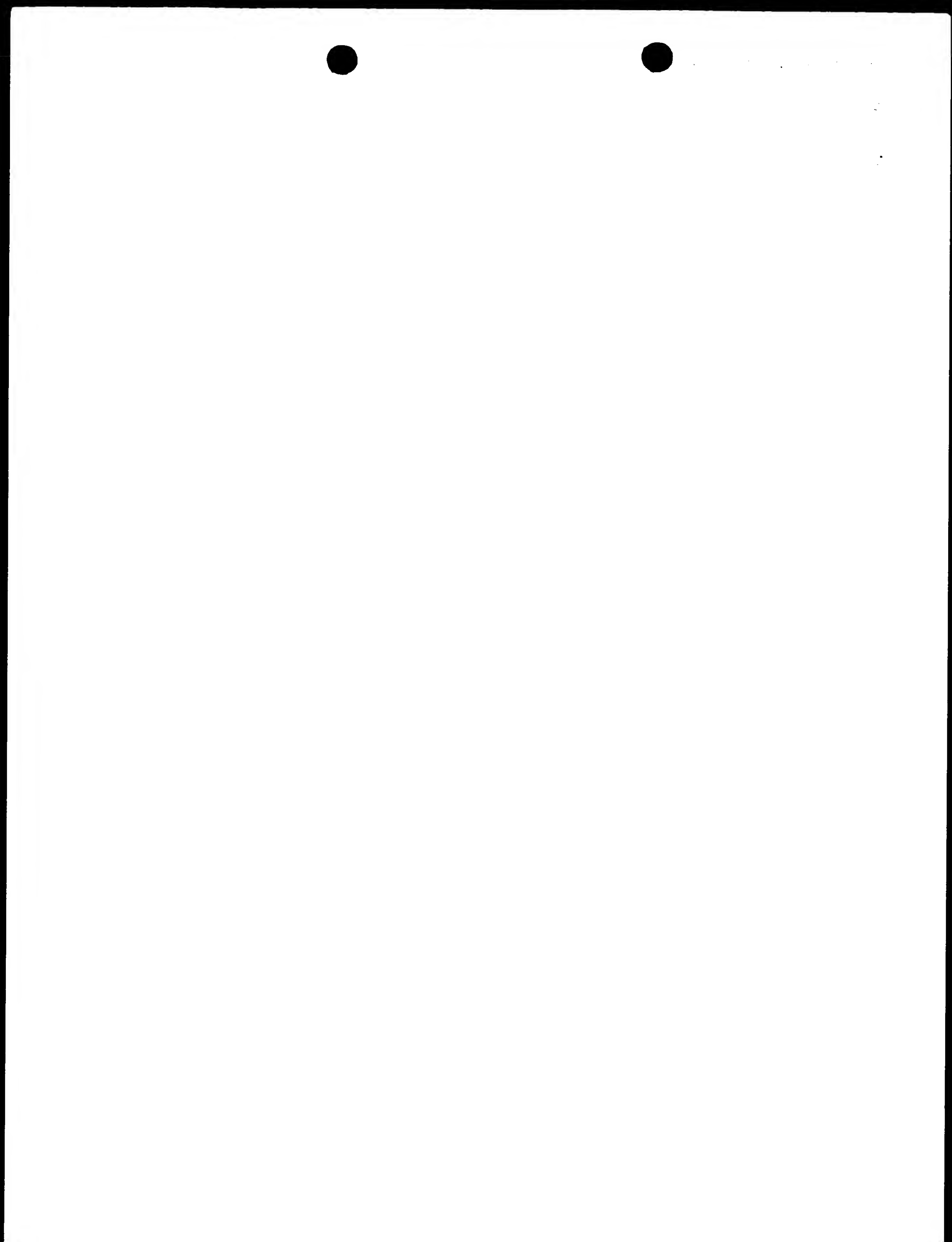
wherein a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, are independently a natural or non-natural amino acid, a peptide consisting of natural or non-natural amino acids, a carbon chain, or carbon cyclic group(s),

wherein RL1 to RL6 and RCal to RCa5 are selected from molecules having chemical binding functions L1 to L6 and LCa1 to LCa5, respectively, wherein said



chemical functions L1 to L6 comprise either at least a positively charged donor of a hydrogen bond, or at least a negatively charged acceptor of a hydrogen bond, said chemical functions LCa1 to LCa5 comprising an oxygen atom, and

wherein a in the structures of construction (IV) and (V) is such that RL6 and RCa5 are distant from 0 to 0.35 nm and such that L6 and LCa5 are distant from 0 to 0.3 nm, b in the structures of construction (IV) and (V) is such that RCa5 and RCa4 are distant from 0 to 0.35 nm and such that LCa5 and LCa4 are distant from 0.2 to 0.3 nm, b' in the structure of construction (VI) is such that RL6 and RCa4 are distant from 0 to 0.35 nm and such that L6 and LCa4 are distant from 0 to 0.35 nm, c and d are such that RCa4 and RCa3 are distant from 0.5 to 0.9 nm, LCa4 and LCa3 are distant from 0.2 to 0.4 nm, RCa3 and RCa2 are distant from 0.35 to 0.6 nm, and LCa3 and LCa2 are distant from 0.22 to 0.3 nm, e, f, g, in the structures of construction (IV), (V), (VI) are such that RL1 and RL2 are distant from 0.45 to 0.65 nm, RCa1 to RCa2 are distant from 0.4 to 0.55 nm, L1 and L2 are distant from 0.4 to 0.55 nm and LCa1 and LCa2 are distant from 0.3 to 0.4 nm, h, i, j and k are such that RL2 and RL3 are distant from 0.5 to 1.05 nm, L2 and L3 are distant from 0.4 to 0.6 nm, RL3 and RL4 are distant from 0.5 to 0.8 nm, L3 and L4 are distant from 0.35 to 0.5 nm, RL4 and RL5 are distant from 0.45 to 0.75 nm, L4 and L5 are distant from 0.4 to 0.55 nm, RL5 and RL6 are distant from 0.4 to 1.2 nm, and L5 and L6 are distant from 0.4



to 0.6 nm, a' in the structure of construction (VI) is such that RL5 and RL6 are distant from 0.4 to 1.2 nm and such that L5 and L6 are distant from 0.4 to 0.6 nm, and b' in the structure of construction (VI) is such  
5 that RL6 and RCa4 are distant from 0 to 0.35 nm and such that L6 and LCa4 are distant from 0 to 0.35 nm, wherein the structure may either be closed or open at a and/or at h.

10 3. The chemical structure according to claim 1, wherein L1, L2, L3 and L6 each have at least a positively charged donor of a hydrogen bond, and L4 and L5 each have at least a negatively charged acceptor of a hydrogen bond.

15 4. The chemical structure according to claim 2, wherein L1, L2, L3 and L6 each have at least a positively charged donor of a hydrogen bond, and L4, L5, LCa5, LCa4, LCa3, LCa2 and LCa1 each have at least  
20 a negatively charged acceptor of a hydrogen bond.

5. The chemical structure according to claim 1, wherein U, V, W, X, Y and Z are peptides consisting of natural and non-natural amino acids, and RL1 to RL6 are  
25 amino acids selected from a set comprising Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp and Glu, or analogs of the latter, L1 to L6 are the charge-bearing functions of the side chains of said amino acids.

30 6. The chemical structure according to claim 1



or 2, wherein RL1, RL2, RL3 and RL6 are independently selected from Arg, Lys, Orn,

wherein RL4 is independently selected from Asp or Glu, and

5 wherein RL5 is independently selected from Ser, Thr, Asp or Glu, wherein the side chains of these amino acids have chemical functions for binding to the phospholipids L1 to L6, respectively.

10 7. The chemical structure according to claim 3 or 4, wherein RL1 to RL6 are positioned in the space formed by U, V, W, X, Y and Z so that the chemical binding functions L1 to L6 are directly accessible to the negatively charged phospholipid, from their side  
15 chains respectively.

8. The chemical structure according to claim 1, further comprising a calcium site where the calcium ion complexed by this site is one of the ligands of the  
20 phospholipid.

9. The chemical structure according to claim 2, wherein a or a', b or b', c, d, e, f, g, h, i, j, k are peptides consisting of natural or non-natural amino  
25 acids, and RL1 to RL6 are amino acids selected from a set comprising Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp and Glu, or analogs of the latter, L1 to L6 and LCa1 to LCa5 are the charge-bearing functions of the side chains of said amino acids, and RCa1 to RCa5 are natural or non-  
30 natural amino acids.





10. The chemical structure according to claim 8,  
wherein RL1 to RL6 and RCal to RCa2 are positioned in  
the space formed by a, b, c, d, e, f g, h, i, j and k  
5 so that the chemical binding functions L1 to L6  
respectively and the positive charges of the calcium  
atom when it is bound to the binding functions LCal to  
LCa5, are directly accessible to the phospholipid.

10 11. The chemical structure according to any of the  
preceding claims, wherein at least a portion of the  
platform is a portion of a domain of the annexin or of  
a modified domain of the annexin, comprising at least  
one of said residual ligands, RL1 to RL6, having said  
15 functions L1 to L6 for binding to the phospholipid  
respectively.

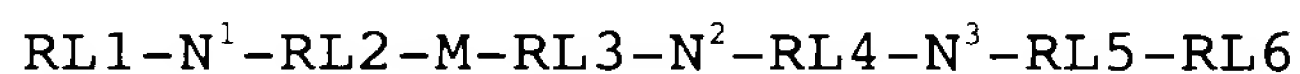
12. The chemical structure according to any of  
claims 1 to 10, wherein the platform is a portion of a  
20 domain of the annexin or of a modified domain of the  
annexin, comprising at least said residual ligands, RL1  
to RL6, having said functions L1 to L6 for binding to  
the phospholipid respectively.

25 13. The chemical structure according to claim 12,  
wherein the annexin domain is selected from the  
domain 1 of annexin V shown in Fig. 6b, domain 2 of  
annexin I shown in Fig. 6a, domain 2 of annexin III  
shown in Fig. 6c and domain 1 and 2 of annexin IV shown  
30 in Fig. 6d.



14. The chemical structure according to claim 13, wherein the residual ligands RL1 to RL6 respectively are either the residues Arg25, Lys29, Arg63, Asp68, Ser71 and Glu72 of domain 1 of annexin V shown in Fig. 6b or residues Arg124, Lys128, Arg162, Asp167, Ser170 and Asp171 of domain 2 of annexin I shown in Fig. 6a, or residues Lys100, Lys104, Lys138, Asp143, Ser146 and Glu147 of domain 2 of annexin III shown in Fig. 6c, or residues Arg97, Lys101, Arg135, Asp140, Ser143 and Asp144 of domain 2 of annexin IV shown in Fig. 6d, or residues Arg24, Lys28, Arg62, Asp67, Ser70 and Glu71 of domain 1 of annexin IV shown in Fig. 6d.

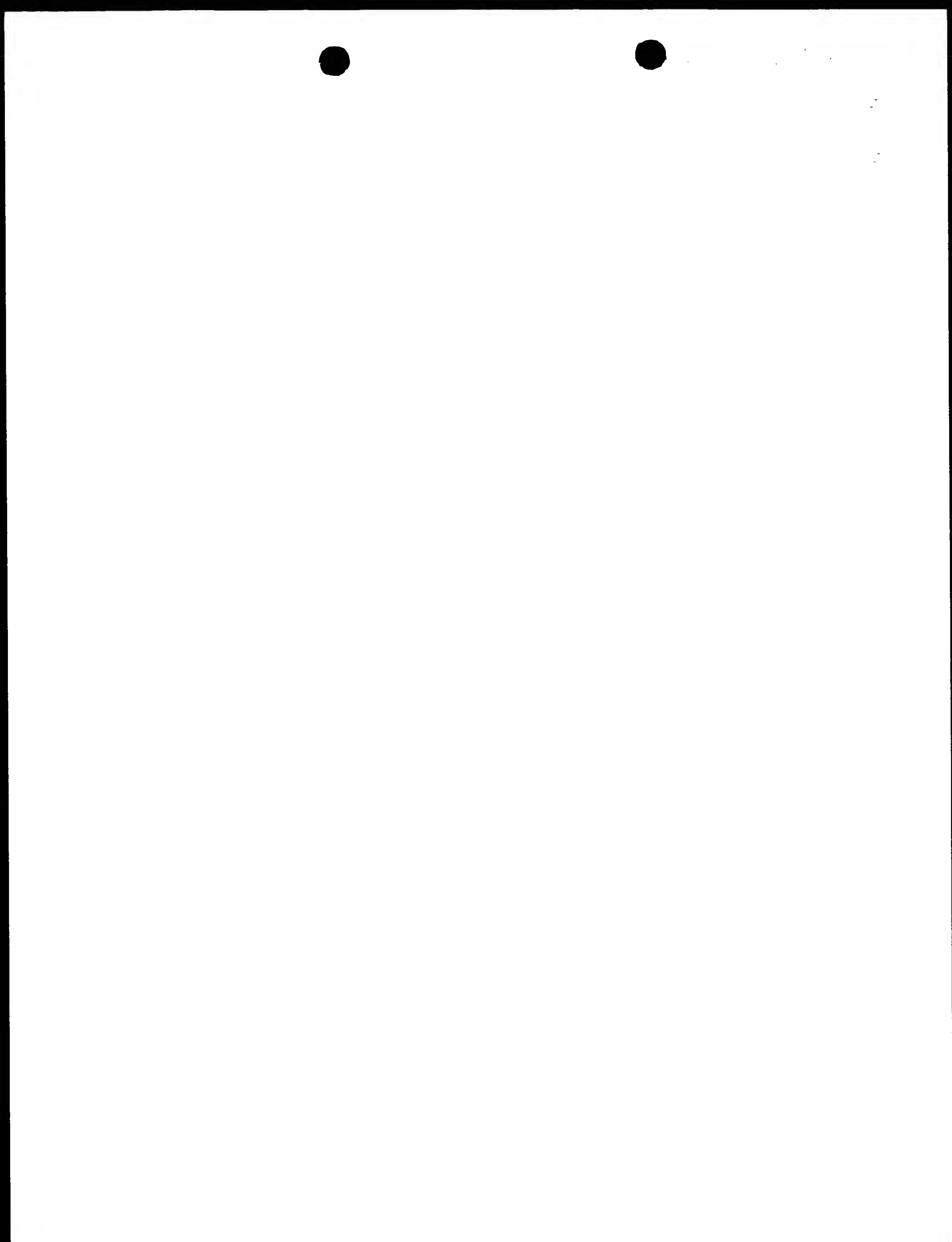
15. A chemical structure with an affinity for a phospholipid, characterized in that it comprises a molecule with the following formula (VII):



(VII)

wherein  $N^1$  to  $N^3$  each independently represent 1 to 4, independently selected, natural or non-natural, amino acids and wherein M is a peptide consisting of 1 to 100 natural or non-natural amino acids;

wherein RL1, RL2, RL3 and RL6 are independently selected from Lys, Arg or Orn; RL4 is independently selected from Asp or Glu; and RL5 is independently selected from Ser, Thr, Asp, or Glu, wherein said structure is linear or cyclic.



16. The chemical structure according to claim 15, wherein  $N^1$  represents three amino acids,  $N^2$  represents four amino acids, and  $N^3$  represents two amino acids.

5

17. The chemical structure according to claim 15 or 16, wherein M is a peptide consisting of 33 natural or non-natural amino acids.

10        18. The chemical structure according to claim 15, wherein the structure of formula (VII) is a peptide sequence selected from the peptide sequence from Arg124 to Ser171 in the ID No.1 sequence shown in Fig. 6a, the peptide sequence from Arg25 to Glu72 in the ID No.2  
15        sequence shown in Fig. 6b, the peptide sequence from Lys100 to Glu147 in the ID No.3 sequence shown in Fig. 6c, the sequence from Arg24 to Glu71 in the ID No.4 sequence shown in Fig. 6d, the sequence from Arg97 to Asp144 in ID No.5 sequence shown in Fig. 6, or  
20        a modified sequence of these sequences provided that RL1, RL2, RL3 and RL6 are independently selected from Lys, Arg, or Orn, RL4 is independently selected from Asp or Glu, and RL5 is independently selected from Ser, Thr, Asp or Glu.

25

19. A chemical structure with an affinity for a phospholipid, characterized in that it comprises at least a portion of a peptide sequence selected from ID No.1 sequence shown in Fig. 6a, ID No.2 sequence  
30        shown in Fig. 6b, ID No.3 sequence shown in Fig. 6c,



and ID No.4 and No.5 sequences shown in Fig. 6d or a modified sequence of the latter.

20. A chemical structure with an affinity for a  
5 negatively charged phospholipid, characterized in that it comprises a cyclic peptide sequence of the following formula (VIII):

Gly-RL1-Phe-RL2-P<sup>1</sup>-Gly-Tyr-P<sup>2</sup>-RL3-P<sup>3</sup>-RL4-Q<sup>1</sup>-RL5-Trp-RL6  
10

wherein RL1 and RL6 are independently selected from Lys, Orn and Arg; RL2 and RL3 are Arg; RL4 and RL5 are independently selected from Asp and Glu;

wherein P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> and P<sup>3</sup> are independently selected  
15 from Ser and Thr; wherein Q<sup>1</sup> is selected from Gly and Met.

21. The chemical structure according to any of claims 15 to 19, further comprising a calcium site  
20 where the calcium ion is complexed by this site forms one of the ligands of the negatively charged phospholipid.

22. The chemical structure according to any of the  
25 preceding claims, said structures having an affinity for a phospholipid selected from a phosphatidylserine, a phosphatidylethanolamine, a phosphatidylinositol, a phosphatidic acid, and a cardiolipid.

30 23. A chemical assembly having an affinity for a





phospholipid, characterized in that it comprises at least two identical or different chemical structures defined in claims 1 to 22, said structures being bound.

5        24. A chemical assembly according to claim 23, wherein at least one of the chemical structures is one of the chemical structures defined in claims 15 to 22.

10        25. A method for producing a chemical structure as defined in any of the preceding claims 11 to 22, characterized in that it comprises steps consisting of preparing a cDNA comprising a coding sequence of bases for said chemical structure, inserting the cDNA in an appropriate expression vector, transforming an  
15 appropriate host cell for replicating the plasmid and producing said structure by translation of said cDNA.

20        26. The method according to claim 25, wherein the vector is a plasmid.

27. The method according to claim 25, wherein the vector is a pGEX-2T vector.

25        28. The method according to claim 25, 26 or 27 wherein the appropriate host cell is *E. Coli*.

29. A use of a chemical structure as defined in claims 1 to 22 for preparing a drug.

30        30. A use of a chemical assembly as defined in



claims 23 or 24 for preparing a drug.

31. The use according to claim 29 or 30, wherein the drug is selected from a drug for treating a thrombosis, a drug for treating a tumor, a drug with an anti-inflammatory action.

32. A use of a structure as defined in claims 1 to 21 for producing a material for covering thrombogenic biomaterial.

33. A labelling compound characterized in that it comprises a structure as defined in claims 1 to 22 coupled with a labelling molecule.

34. A labelling compound characterized in that it comprises an assembly as defined in claim 23 or 24 coupled with a labelling molecule.

35. The compound according to claim 33 or 34, wherein the labelling molecule is selected from a fluorescent molecule, the avidin-biotin complex, a radioelement, and a paramagnetic compound.

36. A diagnose kit comprising a compound according to any of claims 33 to 35.

37. The diagnose kit according to claim 36, further comprising an adequate reagent enabling said labelling molecule to be detected.



38. A kit for analyzing and detecting negative charges at the surface of cells, characterized in that it comprises a structure according to any of claims 1 to 22, coupled with a tracer.

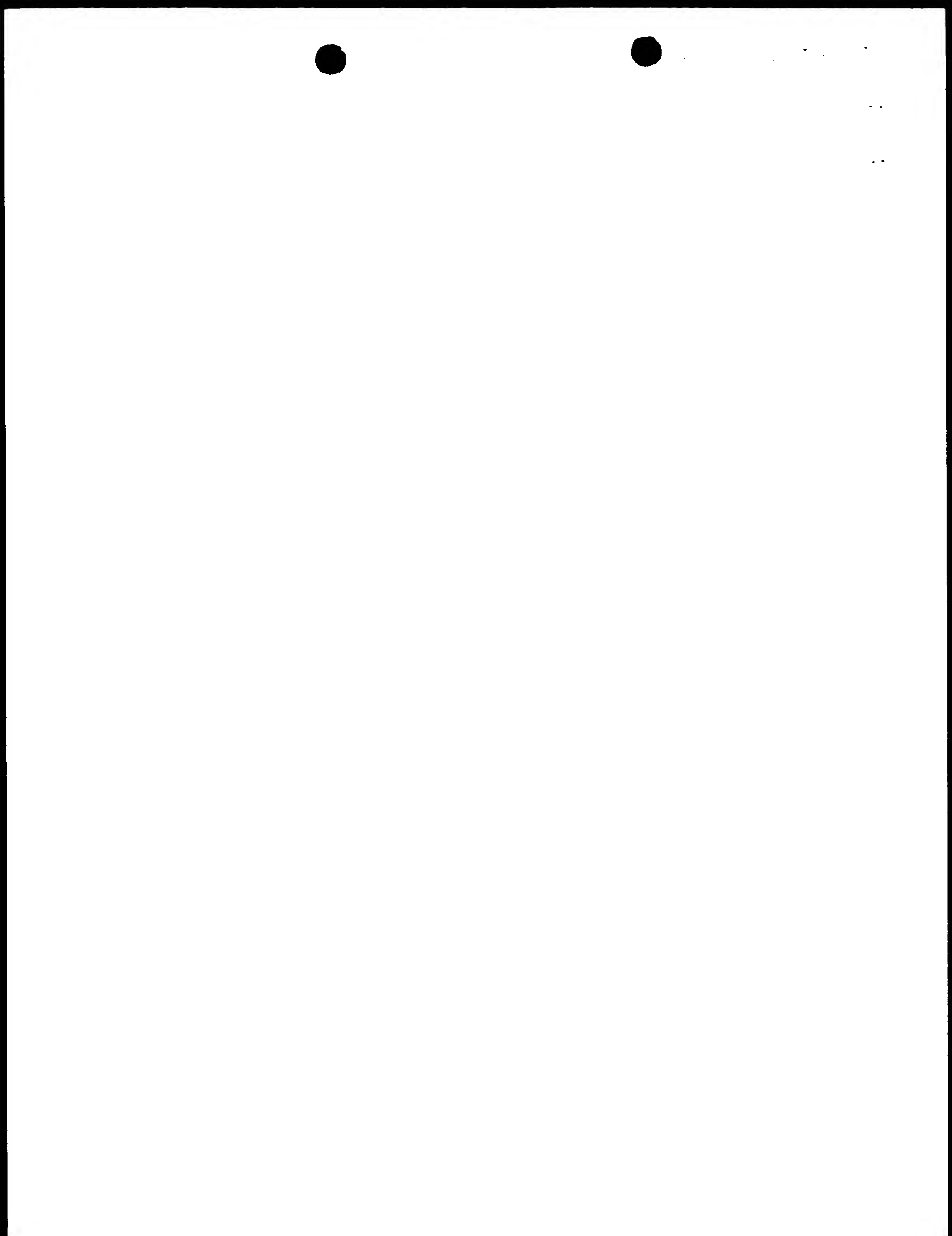
5

39. A kit for analyzing and detecting negative charges at the surface of cells, characterized in that it comprises an assembly according to any of claims 23 or 24, coupled with a tracer.

10

40. A kit for analyzing and detecting microvesicles in blood at the surface of cells, characterized in that it comprises a structure according to any of claims 1 to 22, coupled with a  
15 tracer.

41. A kit for analyzing and detecting microvesicles in blood at the surface of cells, characterized in that it comprises an assembly  
20 according to any of claims 1 to 22, coupled with a tracer.



English translation of the amended sheets of  
International Preliminary Examination Report  
to provide stiffness compatible with the affinity  
towards the phospholipid.

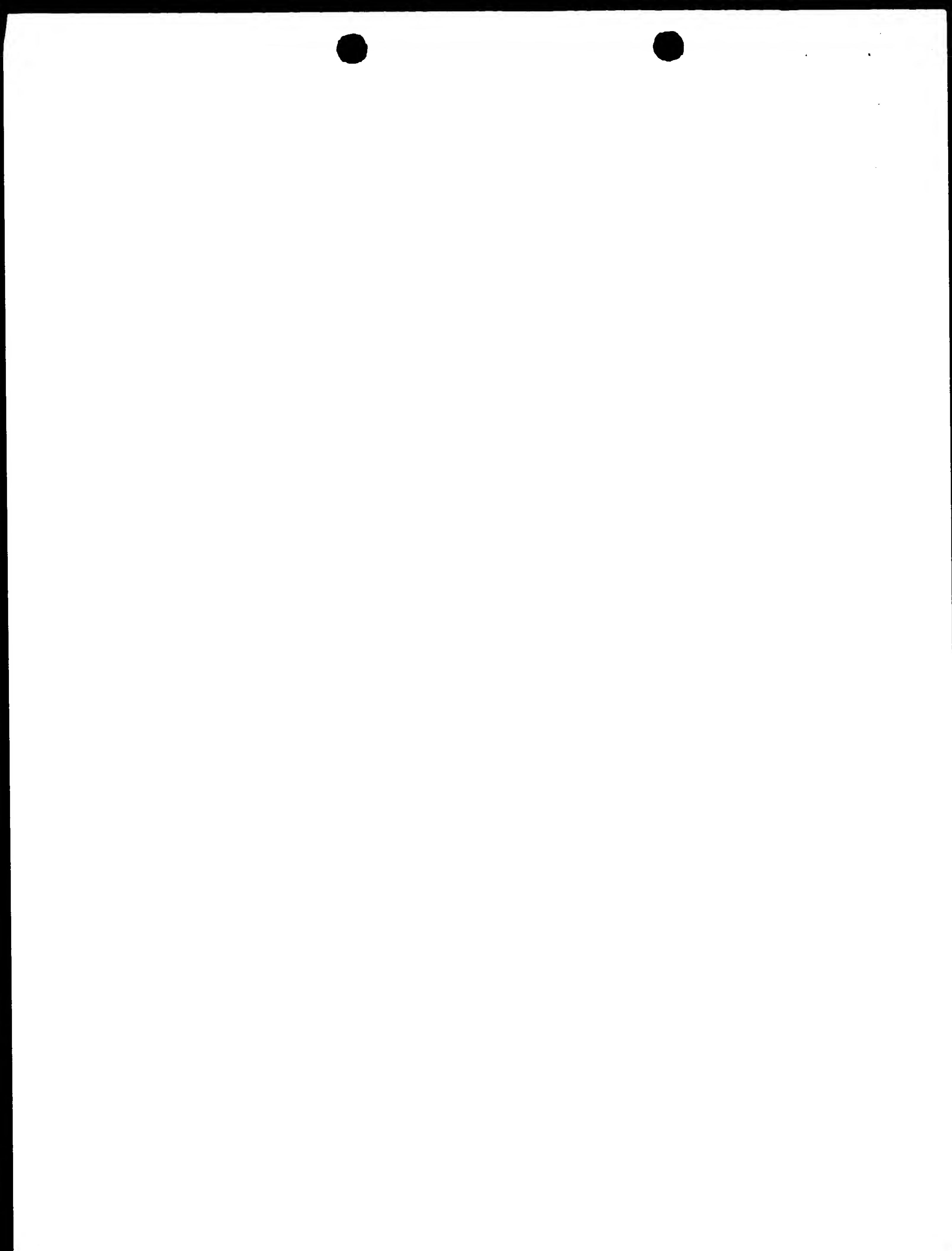
The measured distances when RLs and RCas are amino  
acids, may be measured between the  $\alpha$  carbon atoms of  
5 these amino acids in the aforementioned structures (I)  
to (VI).

These structures may be synthesized by  
conventional synthesis methods of organic chemistry and  
of protein chemistry, by genetic recombination, by  
10 genetic engineering, etc.

Examples of such structures are notably given in  
"Discovery of Sequence-Selective Peptide Binding by  
Synthetic Receptors Using Encoded Combinatorial  
Libraries", W.C. Still, Acc. Chem. Res., 1996, 29, 155-  
15 163 and in "Toward Synthetic Adrenaline Receptors:  
Strong, Selective and Biomimetic Recognition of  
Biologically Active Amino Alcohols by Bisphosphonate  
Receptors Molecules", T. Shrader, J. Org. Chem., 1998,  
63, 264-272.

20 According to the invention, in the structure of  
construction (IV), (V) or (VI), L1, L2, L3 and L6 may  
each have at least a positively charged donor of a  
hydrogen bond, and L4, L5, LCa5, LCa4, LCa3, LCa2 and  
LCa1 may each have at least a negatively charged  
25 acceptor of a hydrogen bond.

According to the invention, in the structure of  
construction (I), (II), (II), IV), (V) or (VI), RL1,  
RL2, RL3 and RL6 may be independently selected from  
Arg, Lys, Orn; RL4 may be independently selected from  
30 Asp or Glu; and RL5 may be independently selected from





**English translation of the amended sheets of  
International Preliminary Examination Report**  
Ser, Thr, Asp or Glu, whereby the side chains of these amino acids have chemical functions for binding to the phospholipids L1 to L6, respectively.

According to the invention, in the structure of  
5 construction (IV), (V) or (VI), a or a', b or b', c, d, e, f, g, h, i, j, k may be peptides consisting of natural or non-natural amino acids, and RL1 to RL6 may be amino acids selected from a set comprising Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp and Glu, or analogs of the latter,  
10 L1 to L6 and LCa1 to LCa5 may be the charge-bearing functions of the side chains of said amino acids, and RCa1 to RCa5 may be natural or non-natural amino acids.

According to the invention, in the structure of constructions (IV), (V) or (VI), the carbon atoms RL1  
15 to RL6 and RCa1 to RCa2 may be positioned in the space formed by a, b, c, d, e, f, g, h, i, j and k so that the chemical binding functions L1 to L6 respectively and the positive charges of the calcium atom when the latter is bound to the bond functions LCa1 to LCa5, are  
20 directly accessible to the phospholipid.

According to the invention, in the structure of construction (I), (II), (III), (IV), (V) or (VI), at least a portion of the platform may be a portion of a domain of the annexin or of a modified domain of the  
25 annexin, comprising at least one of said residual ligands RL1 to RL6, having said functions L1 to L6 respectively for binding to the phospholipid.

According to the invention, in the structure of construction (I), (II), (III), (IV), (V), or (VI), the  
30 platform may be a portion of a domain of the annexin or



English translation of the amended sheets of  
International Preliminary Examination Report  
CLAIMS

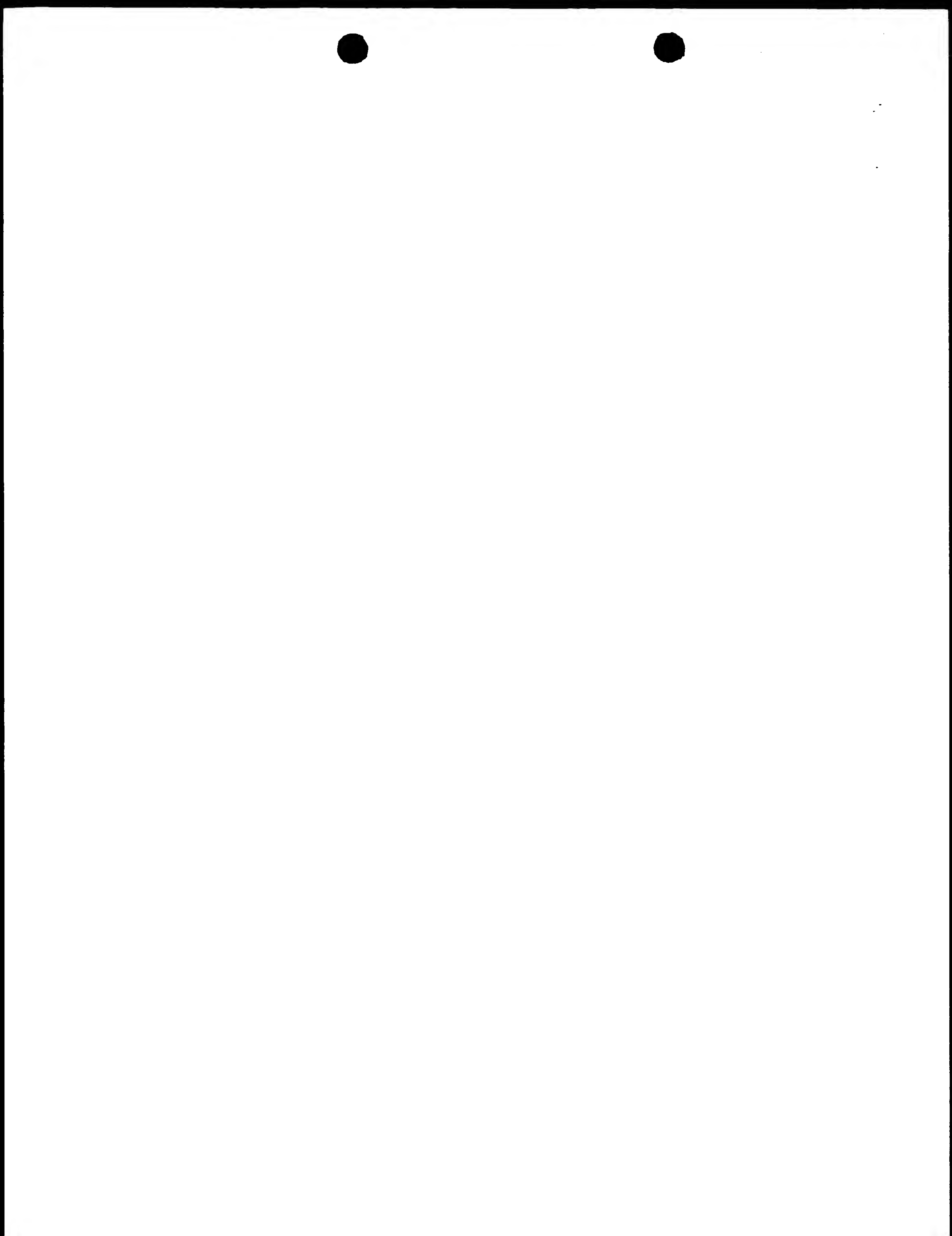
1. A chemical structure with an affinity for a phospholipid, characterized in that it comprises at least a chemical platform U, V, W, X, Y including six residues RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6 supporting a set  
5 of chemical functions which may bind to said phospholipid, called, L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectively, wherein these chemical functions L define the affinity of said structure for said phospholipid, said structure having one of the following  
10 constructions (I), (II) and (III):

## DESSINS X 3

wherein U, U<sup>1</sup>, U<sup>2</sup>, V, W, W<sup>1</sup>, W<sup>2</sup>, X, Y, Z are  
15 independently a natural or non-natural amino-acid, a peptide consisting of natural or non-natural amino-acids, a carbon chain, or carbon cyclic group(s),

wherein RL1 to RL6 are selected from molecules having the binding chemical functions L1 to L6,  
20 respectively, wherein said chemical functions comprise either at least a positive charge, donor of a hydrogen bond, or at least a negative charge, acceptor of a hydrogen bond, and

wherein U, U<sup>1</sup>, U<sup>2</sup>, V, W, W<sup>1</sup>, W<sup>2</sup>, X, Y, Z are such  
25 that RL6 and RL1 are distant from 0.65 to 0.95 nm, L6 and L1 are distant from 0.65 to 0.9 nm, RL1 and RL2 are distant from 0.45 to 0.65 nm, L1 and L2 are distant from 0.4 to 0.55 nm, RL2 and RL3 are distant from 0.5



**English translation of the amended sheets of  
International Preliminary Examination Report**

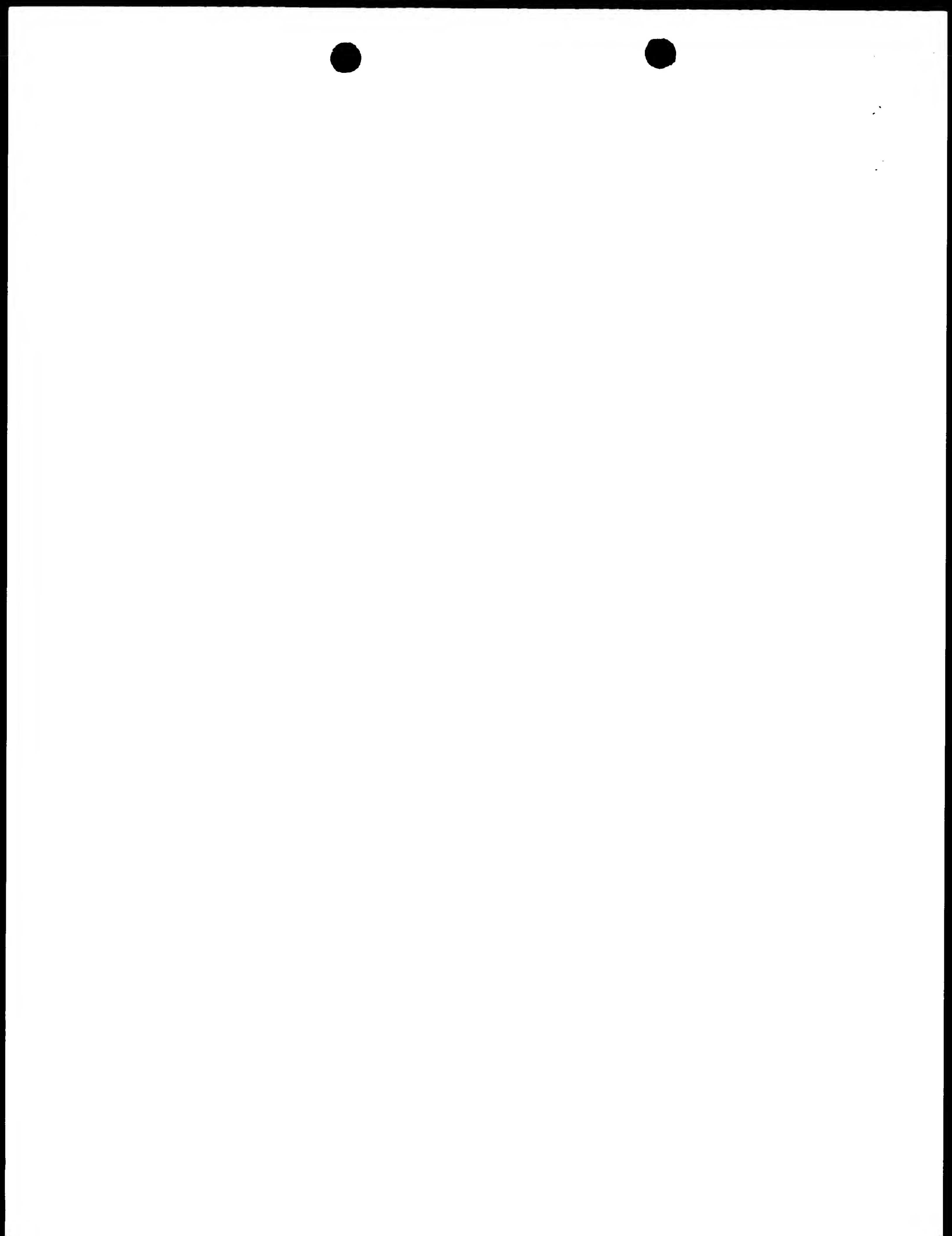
to 1.05 nm, L2 and L3 are distant from 0.4 to 0.6 nm,  
RL3 and RL4 are distant from 0.5 to 0.8 nm, L3 and L4  
are distant from 0.35 to 0.5 nm, RL4 and RL5 are  
distant from 0.45 to 0.75 nm, and L4 and L5 are distant  
5 from 0.4 to 0.55 nm, RL5 and RL6 are distant from 0.4  
to 1.2 nm, L5 and L6 are distant from 0.4 to 0.6 nm.

2. The chemical structure with an affinity for a  
phospholipid, characterized in that it comprises at  
10 least a chemical platform a, a', b, b', c, d, e, f, g,  
h, i, j, k, l including 11 residues, LR1, LR2, LR3,  
LR4, LR5, RL6, RCal, RCa2, RCa3, RCa4 and RCa5  
supporting a set of chemical functions which may bind  
to said phospholipid called L1, L2, L3, L4, L5, L6,  
15 respectively, and a set of chemical functions binding  
to a calcium atom called LCa1, LCa2, LCa3, LCa4, LCa5,  
respectively, wherein these chemical functions RL1 to  
RCa5 define the affinity of said structure for said  
phospholipid, said structure having one of the  
20 following constructions (IV), (V) and (VI):

DESSINS X 3

wherein a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k,  
25 l, are independently a natural or non-natural amino  
acid, a peptide consisting of natural or non-natural  
amino acids, a carbon chain, or carbon cyclic group(s),

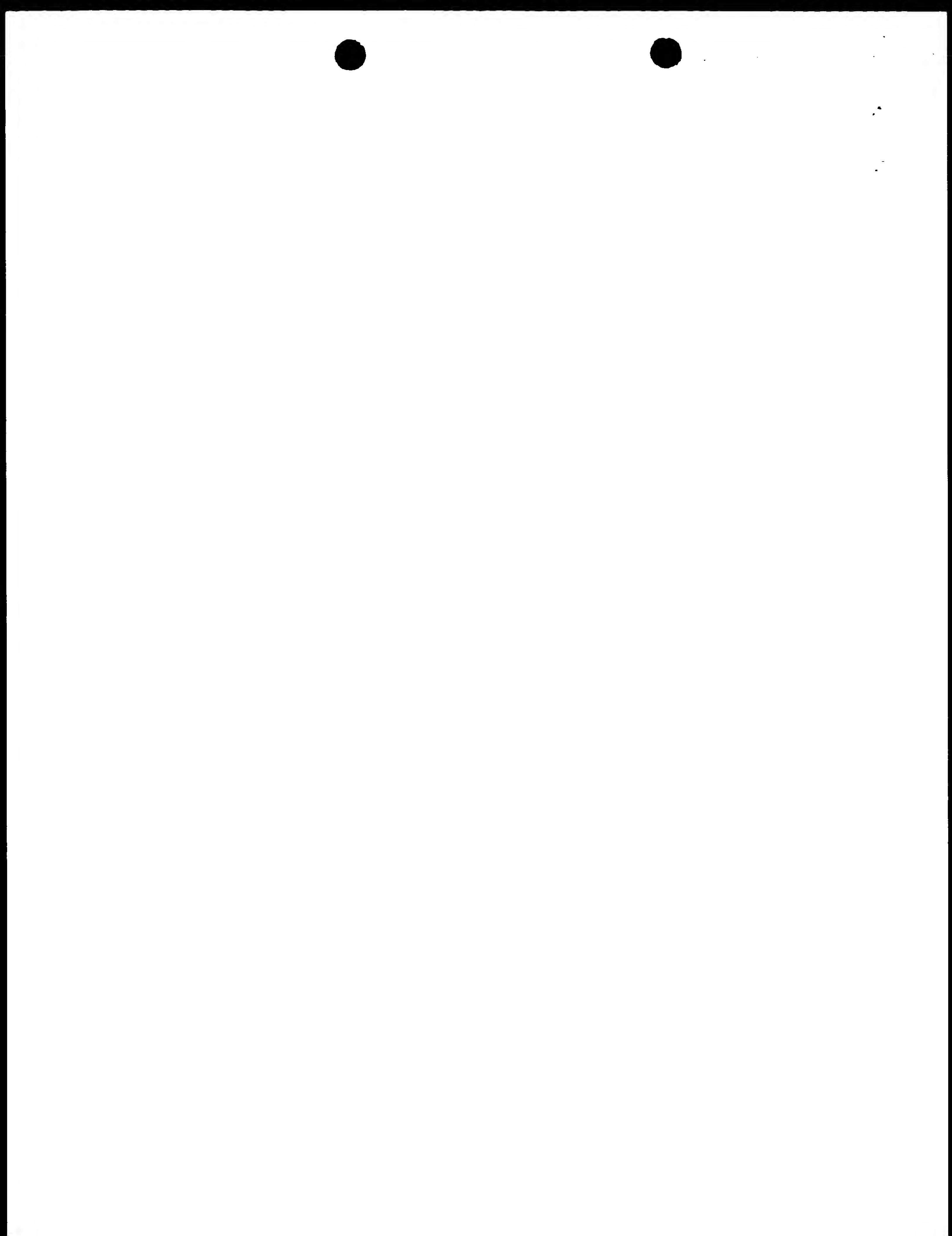
wherein RL1 to RL6 and RCal to RCa5 are selected  
from molecules having chemical binding functions L1 to  
30 L6 and LCa1 to LCa5, respectively, wherein said



**English translation of the amended sheets of  
International Preliminary Examination Report**

chemical functions L1 to L6 comprise either at least a  
positively charged donor of a hydrogen bond, or at  
least a negatively charged acceptor of a hydrogen bond,  
said chemical functions LCa1 to LCa5 comprising an  
5 oxygen atom, and

wherein a in the structures of construction (IV)  
and (V) is such that RL6 and RCa5 are distant from 0  
to 0.35 nm and such that L6 and LCa5 are distant from 0  
to 0.3 nm, b in the structures of construction (IV) and  
10 (V) is such that RCa5 and RCa4 are distant from 0  
to 0.35 nm and such that LCa5 and LCa4 are distant  
from 0.2 to 0.3 nm, b' in the structure of construction  
(VI) is such that RL6 and RCa4 are distant from 0  
to 0.35 nm and such that L6 and LCa4 are distant from 0  
15 to 0.35 nm, c and d are such that RCa4 and RCa3 are  
distant from 0.5 to 0.9 nm, LCa4 and LCa3 are distant  
from 0.2 to 0.4 nm, RCa3 and RCa2 are distant from 0.35  
to 0.6 nm, and LCa3 and LCa2 are distant from 0.22  
to 0.3 nm, e, f, g, in the structures of construction  
20 (IV), (V), (VI) are such that RL1 and RL2 are distant  
from 0.45 to 0.65 nm, RCa1 to RCa2 are distant from 0.4  
to 0.55 nm, L1 and L2 are distant from 0.4 to 0.55 nm  
and LCa1 and LCa2 are distant from 0.3 to 0.4 nm, h, i,  
j and k are such that RL2 and RL3 are distant from 0.5  
25 to 1.05 nm, L2 and L3 are distant from 0.4 to 0.6 nm,  
RL3 and RL4 are distant from 0.5 to 0.8 nm, L3 and L4  
are distant from 0.35 to 0.5 nm, RL4 and RL5 are  
distant from 0.45 to 0.75 nm, L4 and L5 are distant  
from 0.4 to 0.55 nm, RL5 and RL6 are distant from 0.4  
30 to 1.2 nm, and L5 and L6 are distant from 0.4





**English translation of the amended sheets of  
International Preliminary Examination Report**

to 0.6 nm, a' in the structure of construction (VI) is such that RL5 and RL6 are distant from 0.4 to 1.2 nm and such that L5 and L6 are distant from 0.4 to 0.6 nm, and b' in the structure of construction (VI) is such  
5 that RL6 and RCa4 are distant from 0 to 0.35 nm and such that L6 and LCa4 are distant from 0 to 0.35 nm, wherein the structure may either be closed or open at a and/or at h.

10 3. The chemical structure according to claim 1, wherein L1, L2, L3 and L6 each have at least a positively charged donor of a hydrogen bond, and L4 and L5 each have at least a negatively charged acceptor of a hydrogen bond.

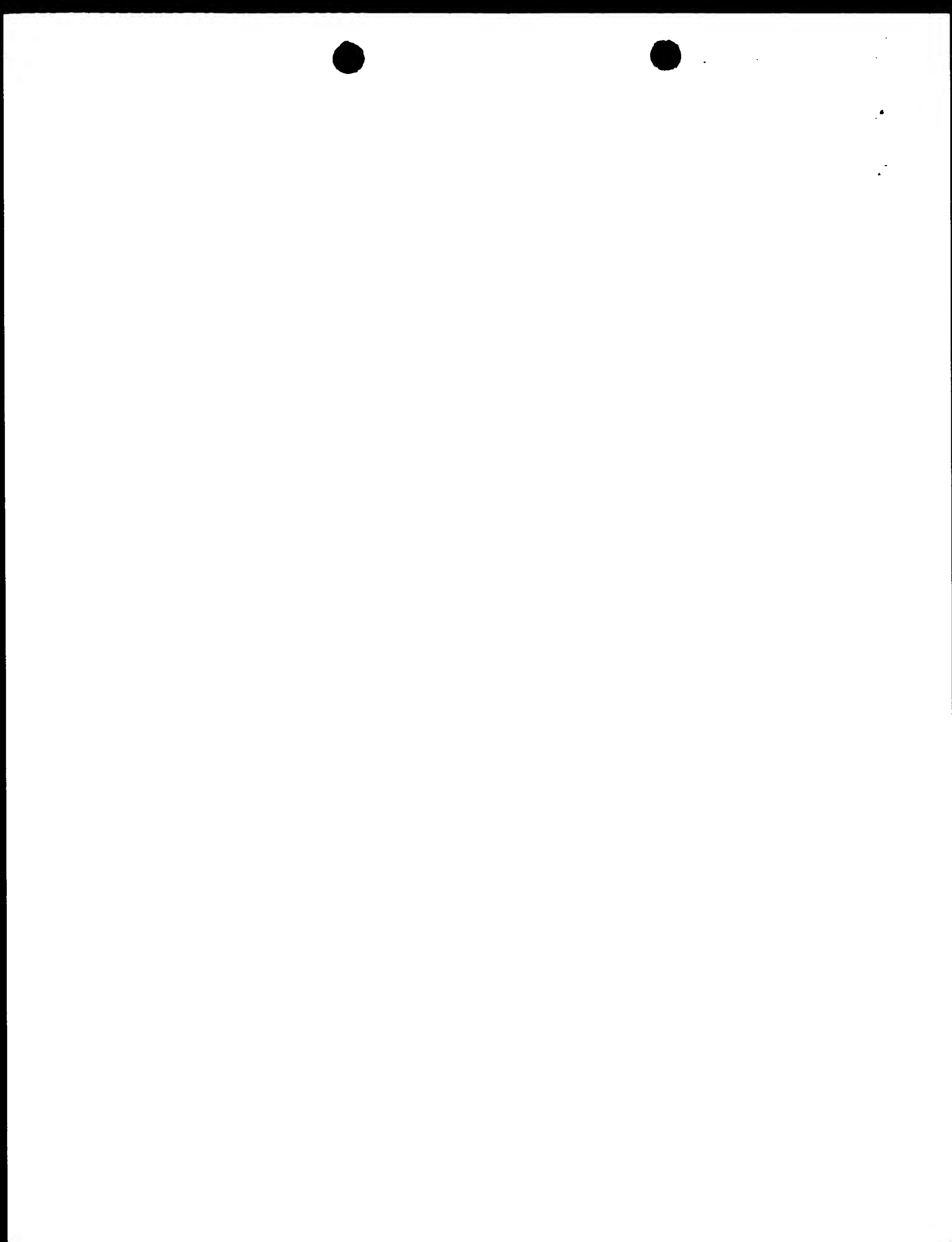
15

4. The chemical structure according to claim 1, wherein U, V, W, X, Y and Z are peptides consisting of natural and non-natural amino acids, and RL1 to RL6 are amino acids selected from a set comprising Lys, Arg,  
20 Orn, Ser, Thr, Asp and Glu, or analogs of the latter, L1 to L6 are the charge-bearing functions of the side chains of said amino acids.

5. The chemical structure according to claim 1,  
25 wherein RL1, RL2, RL3 and RL6 are independently selected from Arg, Lys, Orn,

wherein RL4 is independently selected from Asp or Glu, and

wherein RL5 is independently selected from Ser,  
30 Thr, Asp or Glu, wherein the side chains of these amino



English translation of the amended sheets of  
International Preliminary Examination Report  
acids have chemical functions for binding to the  
phospholipids L1 to L6, respectively.

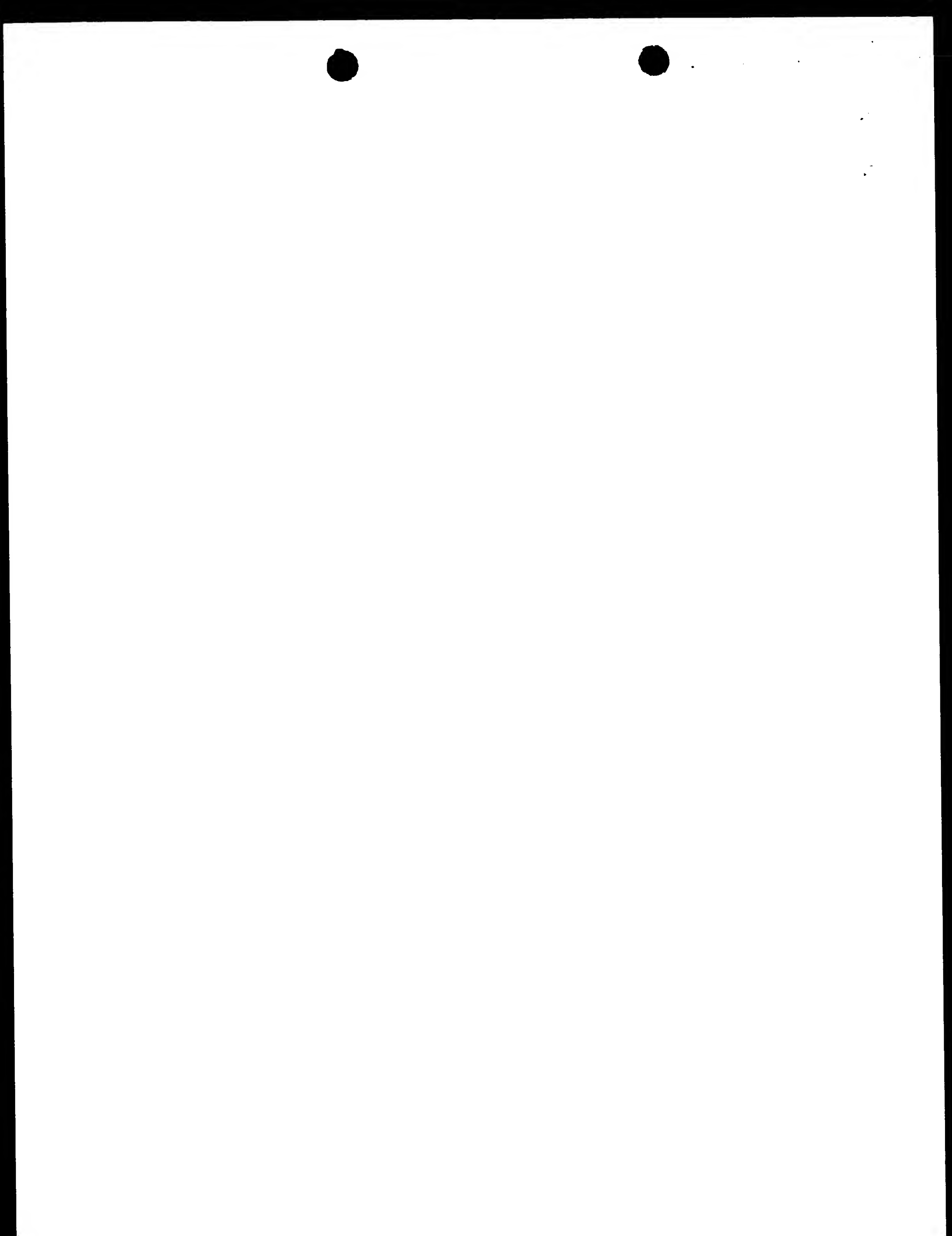
6. The chemical structure according to claim 3,  
5 wherein the chemical binding functions L1 to L6 are  
directly accessible to the negatively charged  
phospholipid.

7. The chemical structure according to claim 1,  
10 further comprising a calcium site where the calcium ion  
complexed by this site is one of the ligands of the  
phospholipid.

8. The chemical structure according to claim 2,  
wherein a or a', b or b', c, d, e, f, g, h, i, j, k are  
15 peptides consisting of natural or non-natural amino  
acids, and RL1 to RL6 are amino acids selected from a  
set comprising Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp and Glu, or  
analogs of the latter, L1 to L6 and LCa1 to LCa5 are  
the charge-bearing functions of the side chains of said  
20 amino acids, and RCa1 to RCa5 are natural or non-  
natural amino acids.

9. The chemical structure according to claim 8,  
wherein the chemical binding functions L1 to L6 and the  
25 positive charges of the calcium atom when it is bound  
to the binding functions LCa1 to LCa5, are directly  
accessible to the phospholipid.

10. The chemical structure according to any of  
30 claims 1 to 9, wherein the platform is a portion of a



English translation of the amended sheets of  
 International Preliminary Examination Report  
 domain of the annexin or of a modified domain of the  
 annexin, comprising at least said residual ligands, RL1  
 to RL6, having said functions L1 to L6 for binding to  
 the phospholipid respectively.

5

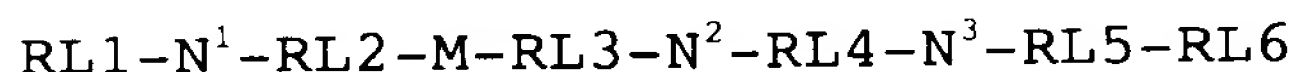
11. The chemical structure according to claim 10,  
 wherein the annexin domain is selected from the  
 domain 1 of annexin V shown in Fig. 6b, domain 2 of  
 annexin I shown in Fig. 6a, domain 2 of annexin III  
 10 shown in Fig. 6c and domain 1 and 2 of annexin IV shown  
 in Fig. 6d.

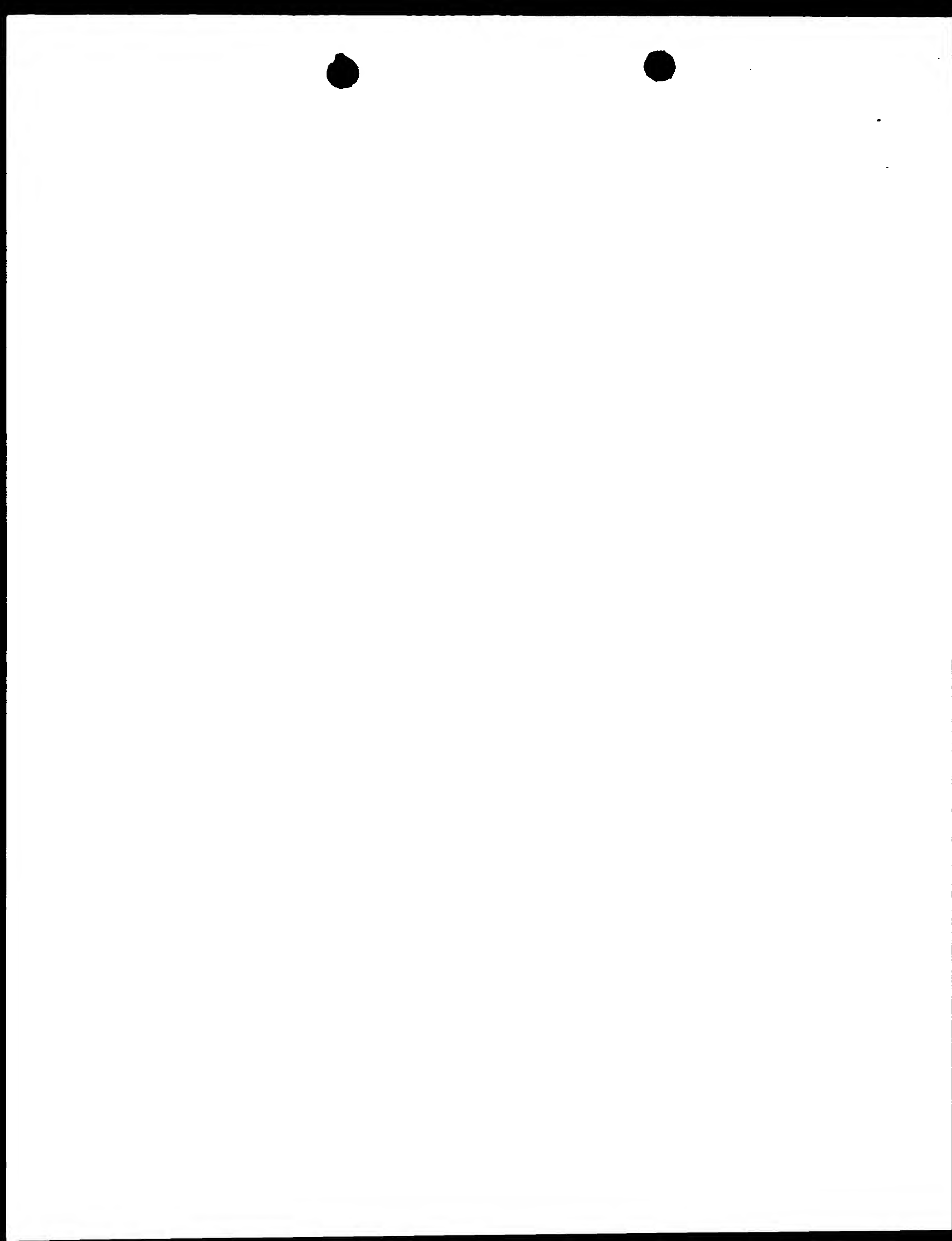
12. The chemical structure according to claim 11,  
 wherein the residual ligands RL1 to RL6 respectively  
 15 are either the residues Arg25, Lys29, Arg63, Asp68,  
 Ser71 and Glu72 of domain 1 of annexin V shown in  
 Fig. 6b or residues Arg124, Lys128, Arg162, Asp167,  
 Ser170 and Asp171 of domain 2 of annexin I shown in  
 Fig. 6a, or residues Lys100, Lys104, Lys138, Asp143,  
 20 Ser146 and Glu147 of domain 2 of annexin III shown in  
 Fig. 6c, or residues Arg97, Lys101, Arg135, Asp140,  
 Ser143 and Asp144 of domain 2 of annexin IV shown in  
 Fig. 6d, or residues Arg24, Lys28, Arg62, Asp67, Ser70  
 and Glu71 of domain 1 of annexin IV shown in Fig. 6d.

25

13. A chemical structure with an affinity for a  
 phospholipid, characterized in that it comprises a  
 molecule with the following formula (VII):

30

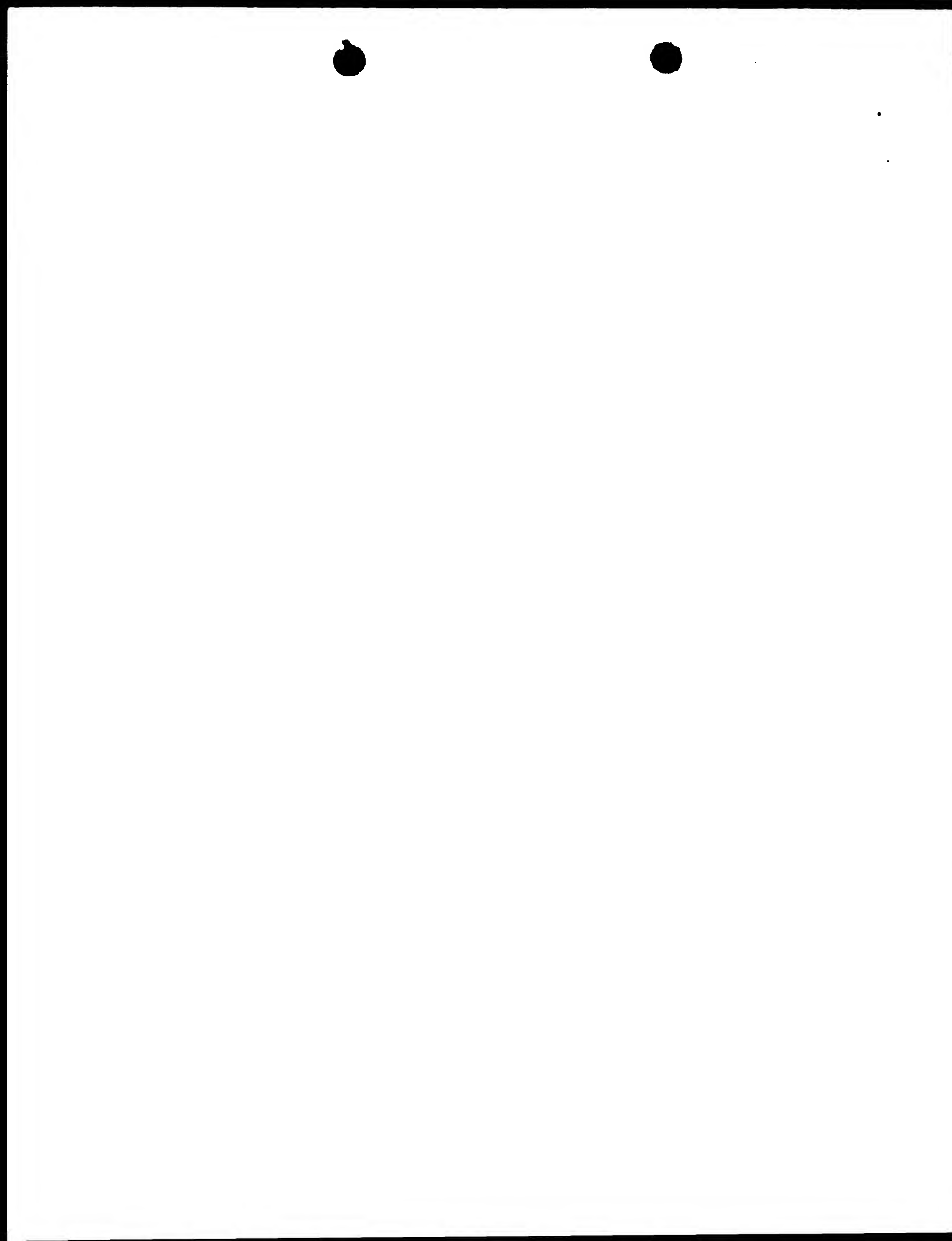




English translation of the amended sheets of  
International Preliminary Examination Report  
(VII)

wherein  $N^1$  to  $N^3$  each independently represent 1  
to 4, independently selected, natural or non-natural,  
5 amino acids and wherein M is a peptide consisting of 1  
to 100 natural or non-natural amino acids

wherein RL1, RL2, RL3 and RL6 are independently  
selected from Lys, Arg or Orn; RL4 is independently  
selected from Asp or Glu; and RL5 is independently  
10 selected from Ser, Thr, Asp, or Glu, wherein said  
structure is linear or cyclic.





9/187923

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 22 DEC 2000

PCT

PCT

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

16T


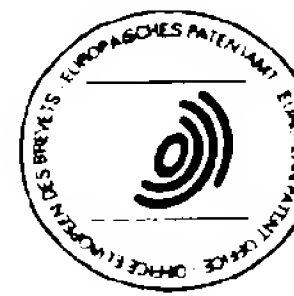
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13117.3 EE	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02329	Date du dépôt international (jour/mois/année) 30/09/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 02/10/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K14/47		
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.		

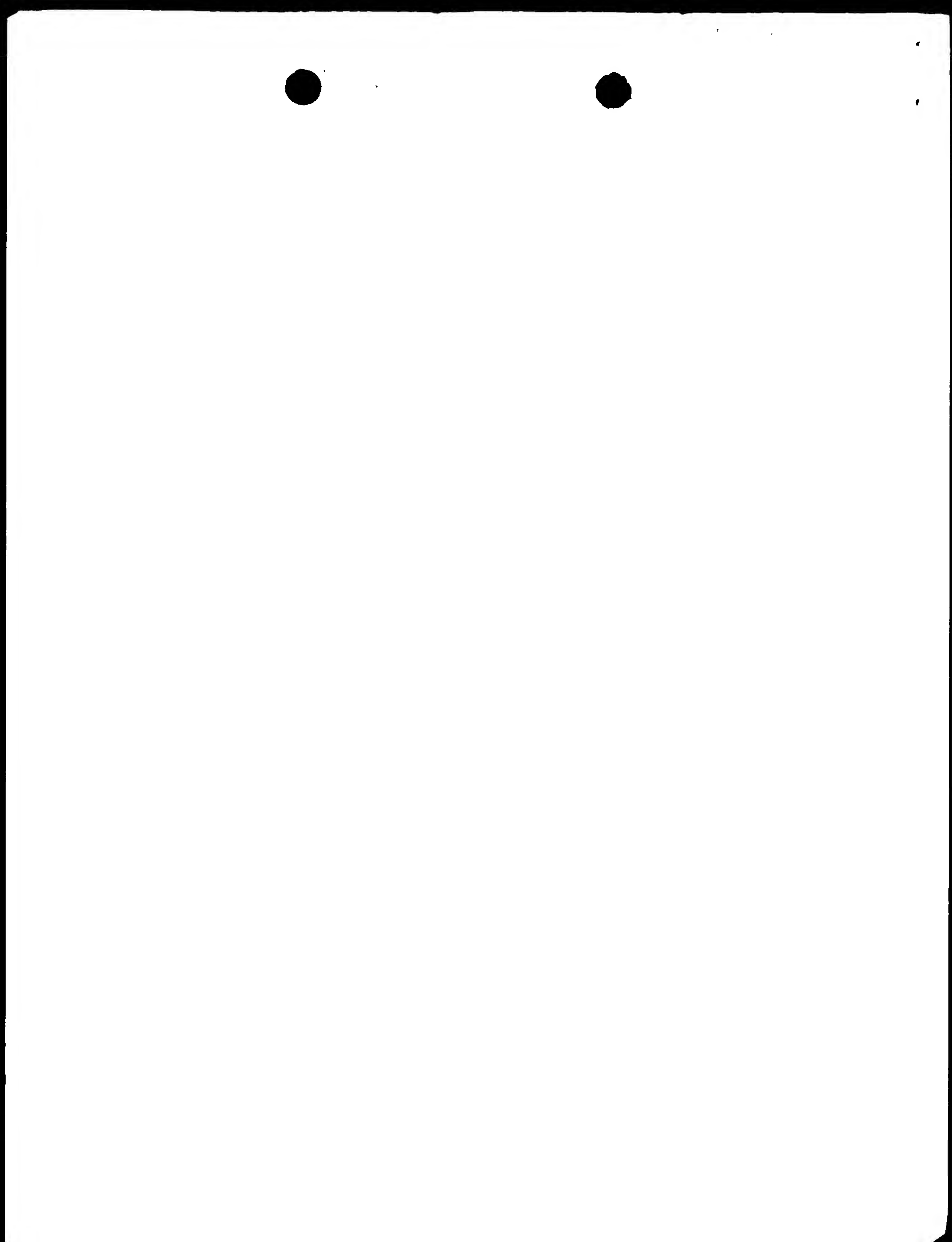
- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 16 feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 28/03/2000	Date d'achèvement du présent rapport 19.12.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Chavanne, F N° de téléphone +49 89 2399 8399 



# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR99/02329

## I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17.)*) :

### Description, pages:

1-12,15-40	version initiale	
13,14	reçue(s) avec télécopie du	27/11/2000

### Revendications, N°:

1-39	reçue(s) avec télécopie du	27/11/2000
------	----------------------------	------------

### Dessins, feuilles:

1/10-10/10	version initiale
------------	------------------

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02329

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n<sup>os</sup> :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté	Oui :	Revendications	1-16, 18
	Non :	Revendications	17, 19-39
Activité inventive	Oui :	Revendications	
	Non :	Revendications	1-39
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	1-39
	Non :	Revendications	

2. Citations et explications  
**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :  
**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :  
**voir feuille séparée**



**V. Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Il est fait référence aux documents suivants:

D1: J. Mol. Biol.

Vol. 279, pages 1163-1175, 1998

D2: WO 92/19279

D3: US-A-5 627 036

2. D1 mentionne différents domaines de l'annexine I humaine, notamment les domaines D1 et D2, et leur expression individuelle dans E. coli. D1 décrit les procédés d'expression, d'isolation et de purification du domaine D2, ainsi que, notamment, des expériences de RMN après marquage radioactif du domaine D2 et solubilisation dans une solution de micelles (résumé; page 1165, colonne 1; page 1168, colonne 2, paragraphe 3; page 1172, colonne 2, dernier paragraphe à page 1173, colonne 2, dernier paragraphe).

L'annexine I humaine mentionnée dans D1 correspond à l'annexine I humaine de SEQ ID No:1 de la figure 6A de la présente application. Bien que D1 ne mentionne pas que la structure chimique qu'il décrit possède une affinité pour un phospholipide, au vu de D1 l'objet des revendications 17, 19, 20, 23-26, 31 et 33 n'est pas nouveau. En effet, l'élucidation de propriétés nouvelles (par exemple, l'affinité pour un phospholipide) d'un produit connu ne permet pas de restaurer la nouveauté de ce produit. Par conséquent, au vu de D1, les revendications 17, 19, 20, 23-26, 31 et 33 ne sont pas nouvelles.

D2 mentionne la propriété des annexines de se lier aux phospholipides chargés négativement de manière calcio-dépendante. D1 décrit notamment l'annexine V humaine, qui montre une très forte affinité en présence de calcium pour les phospholipides tels phosphatidylsérine (PS), phosphatidylcholine (PC), acide phosphatidique (page 7, ligne 17 à page 8, ligne 15; page 15, ligne 21; page 17, lignes 9-14). D2 décrit la production de l'annexine V par clonage de son cDNA dans un vecteur d'expression (page 17, lignes 23 à page 18, ligne 7). D2 mentionne l'utilisation de l'annexine V pour cibler une thrombose in vivo, ainsi que





le marquage radioactif ou fluorescent de l'annexine (page 21, lignes 7-17; page 15, lignes 22-27). D2 décrit une structure chimique comprenant une annexine V ayant une affinité pour des phospholipides conjuguée à un agent thrombolytic. Cette structure est obtenue par clonage et expression dans E. coli (page 1, lignes 7-9; page 10, lignes 15-20; page 21, lignes 20-25; exemples II et III; revendications 1-3; revendication 31). D2 mentionne également l'utilisation de cette structure chimique dans des compositions thérapeutiques et selon des méthodes thérapeutiques pour le traitement de maladies résultant d'une thrombose (page 10, lignes 21-25; revendications 8-10). D2 décrit une séquence peptidique présente dans les différents domaines de l'annexine V ainsi que dans d'autres protéines ayant une affinité pour les phospholipides de manière calcio-dépendante. D2 suggère que cette séquence contient un site calcium et est responsable de la liaison aux phospholipides (page 18, ligne 15 à page 19, ligne 3).

L'annexine V humaine de D2 correspond à l'annexine de SEQ ID No:2 de la figure 6B de la présente application. Par conséquent, l'annexine V décrite dans D2 correspond à une structure chimique telle que définie dans la revendications 17, 19 et 20. L'annexine V est constituée des domaines D1 à D5, qui possèdent chacun la capacité connue de se lier aux phospholipides membranaires et au calcium. L'annexine V correspond donc également à un assemblage chimique tel que défini dans les revendications 23 et 24.

Par conséquent, au vu de D2, les revendications 17 et 19-33 ne sont pas nouvelles.

D3 décrit des annexines humaines, dont l'annexine I (lipocortin I) et l'annexine V (PAP-I), leur marquage avec une molécule fluorescente, un composé paramagnétique ou un radio-isotope, et leur utilisation pour différencier la phosphatidylsérine de la phosphatidylcholine (résumé; colonne 2, lignes 6-18 et 56-59). D3 mentionne également une trousse d'analyse et de détection comprenant ces annexines marquées capables de différencier la phosphatidylsérine de la phosphatidylcholine, pouvant être utilisée notamment pour la détection de microvésicules dans le sang (colonne 2, lignes 50-55; colonne 6, lignes 43-59, revendication 27).

Par conséquent, au vu de D3, les revendications 17, 19-24 et 31-39 ne sont pas nouvelles.



Les revendications 17 et 19-39 ne remplissent donc pas les conditions de l'Article 33(2) PCT.

3. L'objet des revendications 13-16 se différencie de D2 en ce que, dans D2, la région de la molécule d'annexine possédant un site calcium et ayant une affinité pour un phospholipide n'est que suggérée. La région des annexines ayant une affinité pour un phospholipide et présentant un site calcium étant suggérée dans D2, l'homme du métier n'aurait besoin de ne mettre en oeuvre aucune activité inventive pour vérifier l'implication de cette région dans la liaison à un phospholipide ainsi que la présence d'un site calcium. La simple mise en oeuvre de connaissances et de techniques connues dans l'état de la technique, comme par exemple, la mutation ponctuelle d'acides aminés, permet l'identification des acides aminés se liant à un phospholipide ainsi que de ceux participant au site calcium. L'homme du métier n'aurait donc besoin de ne mettre en oeuvre aucune activité inventive pour arriver à l'objet des revendications 13-16. Ces revendications ne sont pas inventives.

L'objet des revendications 1-12 et 18 se différencie en plus de D2, en ce que la structure chimique revendiquée est cyclique. La cyclisation de peptides présentant un site actif afin de leur conférer une stabilité supérieure est parfaitement connue de l'homme du métier et couramment pratiquée. L'homme du métier n'aurait donc besoin de ne mettre en oeuvre aucune activité inventive pour arriver également à l'objet des revendications 1-12 et 18. Par conséquent, ces revendications ne sont pas inventives.

Les revendications 1-16 et 18 ne remplissent donc pas les conditions de l'Article 33(3) PCT.

## **VII. Irrégularités dans la demande internationale**

1. Une erreur de frappe a rendu la revendication 22 dépendante de la revendication 22 au lieu de la revendication 21.

## **VIII. Observations relatives à la demande internationale**



1. Dans les revendications 1 et 2 la formulation "au moins une..." ne définit pas clairement l'étendue de la protection recherchée (Art. 6 PCT).
2. Les constructions (II) et (III) de la revendication 1 manquent totalement de clarté du fait que les espaces entre  $W^1$  et  $W^2$ , et  $U^1$  et  $U^2$ , ainsi que de la ligne en pointillé entre  $U^2$  et  $W^1$  présente dans la construction (III) ne sont pas définis (Art. 6 PCT).
3. L'objet des revendications 1, 2 et 18 n'est pas fondé sur la description. En effet, la description ne contient que des déclarations (pages 5, ligne 31 à page 8, ligne 17; page 9, ligne 9 à page 12, ligne 25; page 17, lignes 7-21), mais aucune base technique concernant des structures chimiques cycliques, telles que celles correspondant aux constructions (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) et (VIII). En effet, la présente application décrit des structures linéaires, mais aucune structure circulaire du type de celles faisant l'objet des revendications 1, 2 et 18 n'a été produite. Dans ce contexte, il est à noter que l'objet pour lequel protection est recherché doit refléter l'état réel de la contribution technique de l'application. De plus, la présente application ne fait aucune référence aux distances entre les fonctions chimiques de liaison L1 à L6. Par conséquent, les revendications 1, 2 et 18 ne sont pas fondées sur la description (Art. 6-fondement PCT; voir également Directives C-III, 6.3).
4. La revendication 17 manque de clarté de part la formulation "elle comprend au moins une partie...". En effet, cette formulation vague et non définie, ne se réfère à aucune caractéristique technique et de ce fait sujette à interprétation, ne permet pas de définir clairement l'étendue de la protection recherchée (Art. 6 PCT).



structuraux pouvant comprendre un nombre de groupes cycliques suffisants pour assurer une rigidité compatible avec l'affinité au phospholipide.

Les distances mesurées lorsque les RL et les RCa  
5 sont des acides aminés, peuvent être mesurées entre les carbones  $\alpha$  de ces acides aminés dans les structures (I) à (VI) précitées.

Ces structures peuvent être synthétisées par les procédés classiques de synthèse de la chimie organique  
10 et de la chimie des protéines, par recombinaison génétique, par génie génétique, etc...

Des exemples de telles structures sont données notamment dans "Discovery of Sequence-Selective Peptide Binding by Synthetic Receptors Using Encoded  
15 Combinatorial Libraries", W.C. Still, Acc. Chem. Res., 1996, 29, 155-163 et dans "Toward Synthetic Adrenaline Receptors : Strong, Selective and Biomimetic Recognition of Biologically Active Amino Alcohols by Bisphosphonate Receptors Molecules", T. Shrader, J.  
20 Org. Chem., 1998, 63, 264-272.

Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), L1, L2, L3 et L6 peuvent présenter chacune au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, et L4, L5, LCa5,  
25 LCa4, LCa3, LCa2 et LCa1 peuvent présenter chacune au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II), (III), RL1, RL2, RL3 et RL6  
30 peuvent être choisis indépendamment parmi Arg, Lys, Orn ; RL4 peut être choisi indépendamment parmi Asp ou Glu ; et RL5 peut être choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, les





chaînes latérales de ces acides aminés présentant les fonctions chimiques de liaison au phospholipides L1 à L6 respectivement.

Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), a ou a', b ou b', c, d, e, f, g, h, i, j, k peuvent être des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL5 peuvent être des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, RL6 peut être Asp ou Glu ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 et LCa1 à LCa5 peuvent être les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides aminés, et RCa1 à RCa5 peuvent être des acides aminés naturels ou non naturels.

Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), les carbones RL1 à RL6 et RCa1 à RCa2 peuvent être disposés dans l'espace formé par a, b, c, d, e, f, g, h, i, j et k de manière à ce que les fonctions chimiques de liaisons L1 à L6 respectivement et les charges positives du calcium lorsque ce dernier est lié aux fonctions de liaison LCa1 à LCa5 soient directement accessibles au phospholipide.

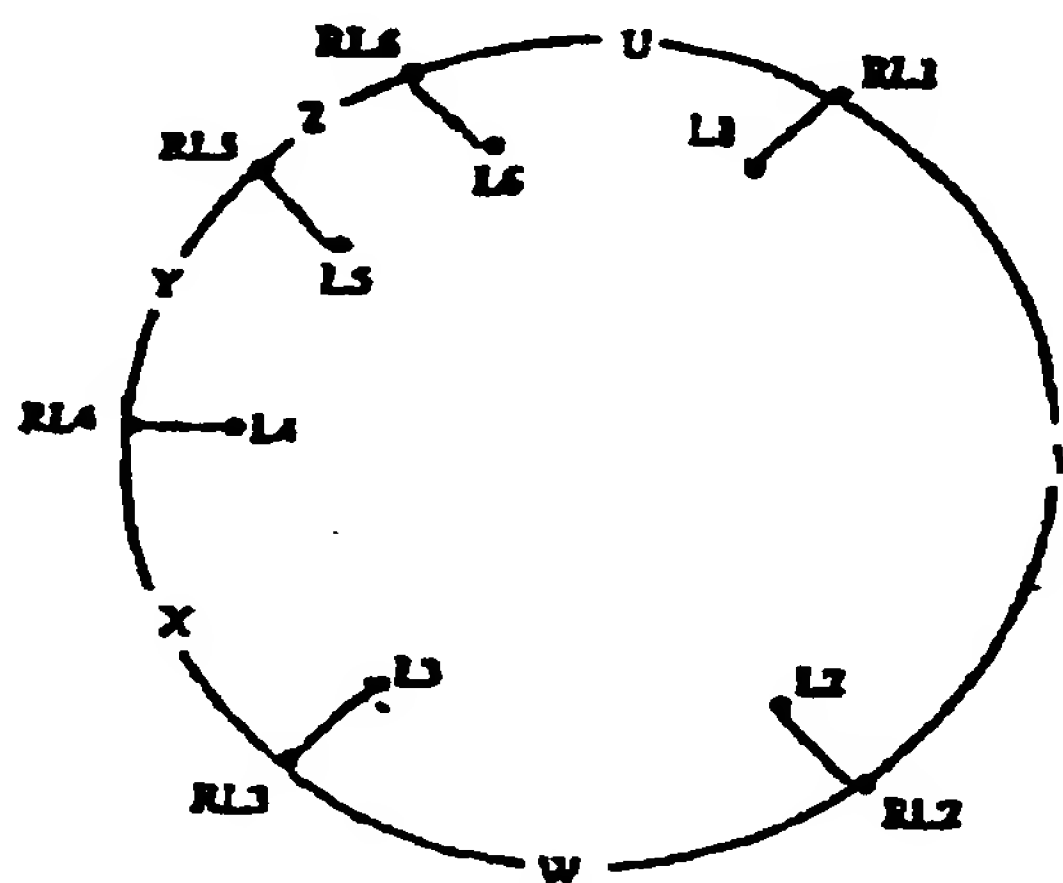
Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II), (III), (IV), (V) ou (VI), au moins une partie de la plate-forme peut être une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine, comprenant au moins un desdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement de liaison au phospholipide.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II), (III), (IV), (V) ou (VI), la plate-forme peut être une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine,



## REVENDICATIONS

1. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'au moins une plate-forme chimique U, V, W, X, Y, Z comportant six résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6 supportant un ensemble de fonctions chimiques pouvant se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, ces fonctions chimiques L définissant l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (I), (II) et (III) suivantes :

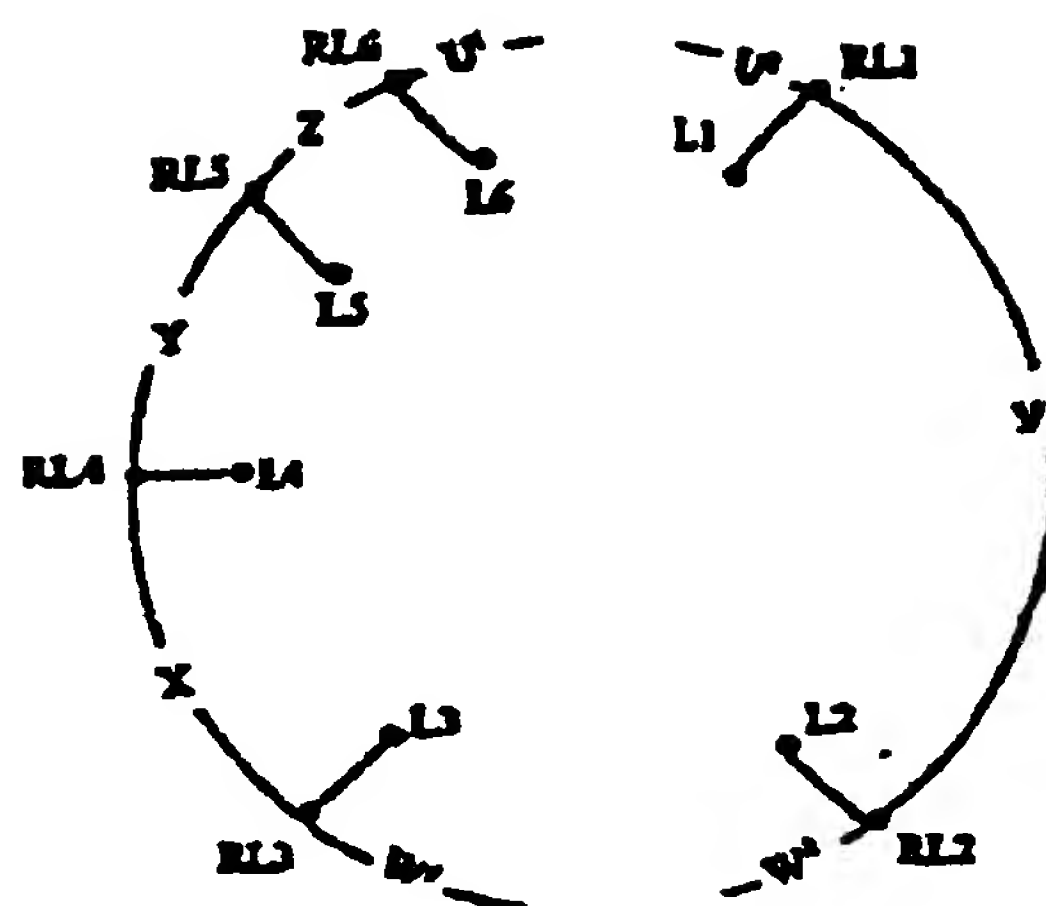


(I)

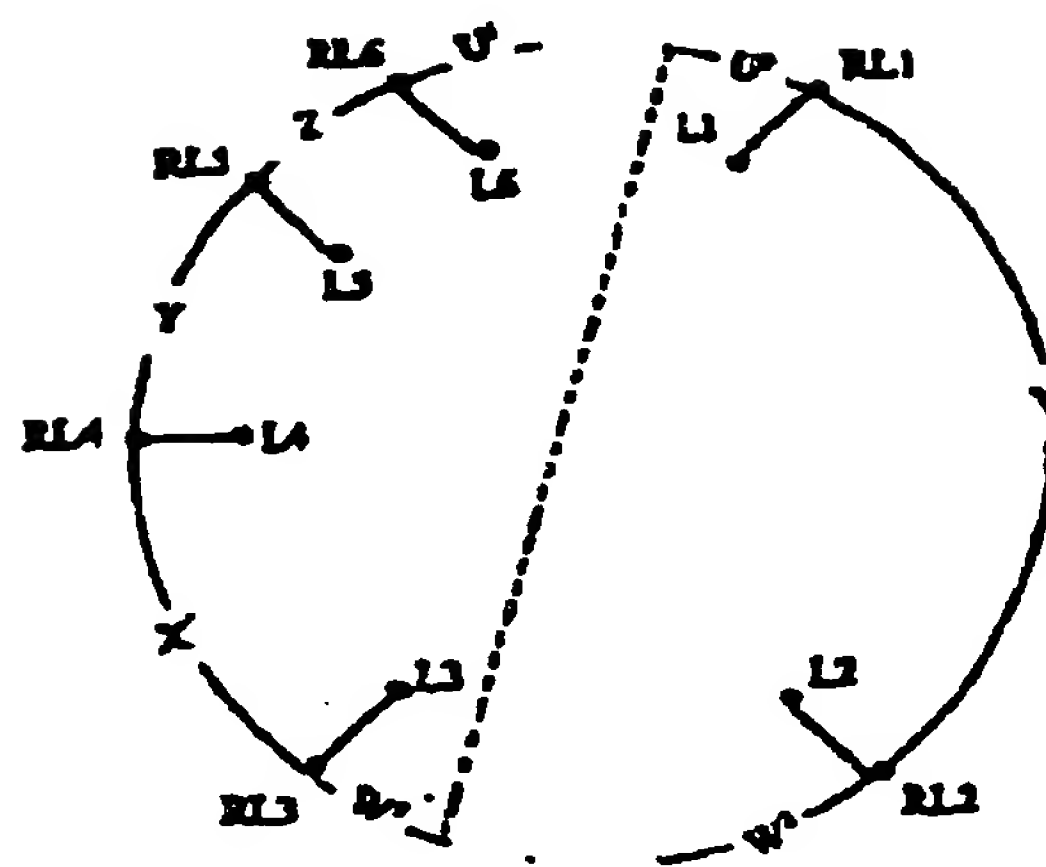
15



42



(II)



(III)

5

dans lesquelles  $U$ ,  $U^1$ ,  $U^2$ ,  $V$ ,  $W$ ,  $W^1$ ,  $W^2$ ,  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$  sont  
indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel,  
un peptide constitué d'acides aminés naturels ou non  
naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s)  
10 cyclique(s) carboné(s),



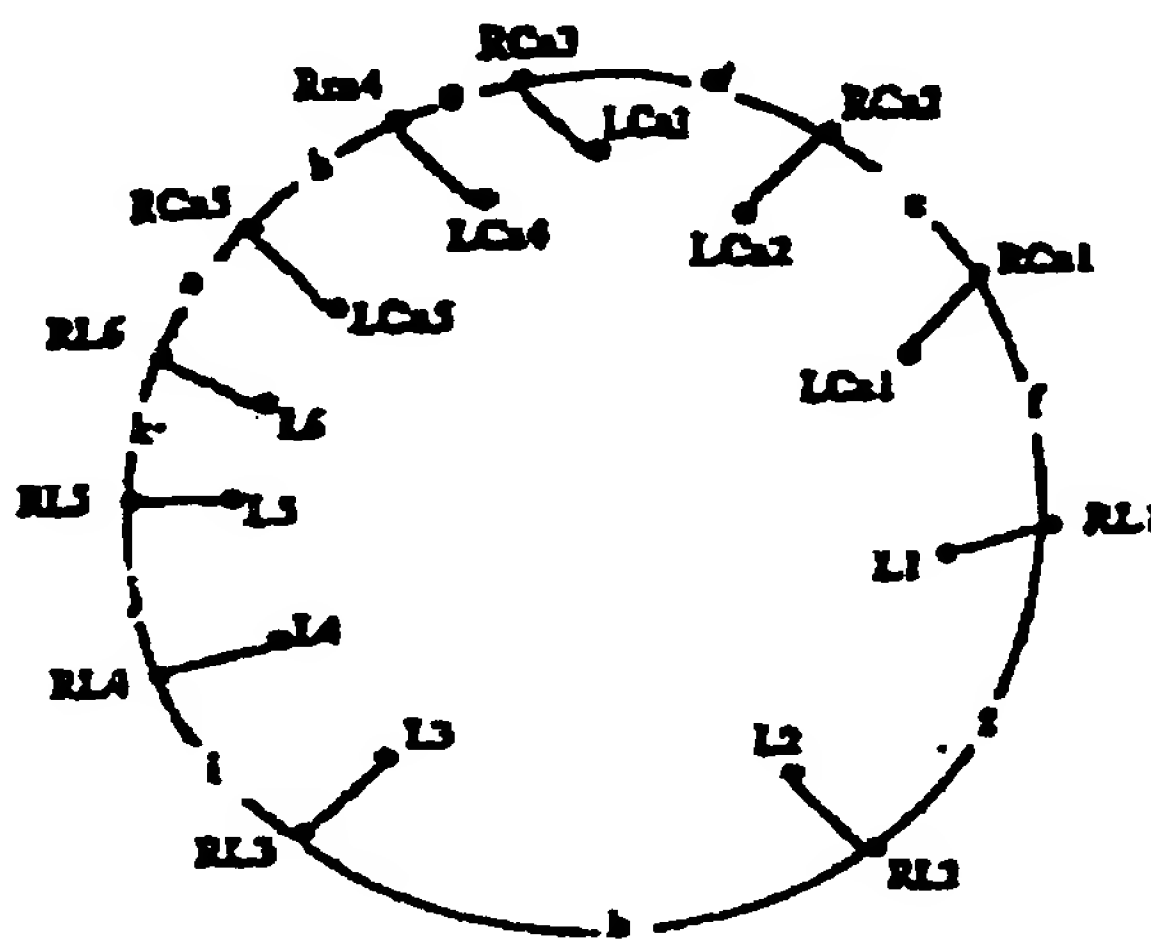
dans lesquelles RL1 à RL6 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement, lesdites fonctions chimiques comprenant soit au moins une charge positive et  
5 donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, et  
dans lesquelles U, U<sup>1</sup>, U<sup>2</sup>, V, W, X, Y et Z sont tels que  
RL6 et RL1 sont distants de 0,65 à 0,95 nm, L6 et L1  
sont distants de 0,65 à 0,9 nm, RL1 et RL2 sont  
10 distants de 0,45 à 0,65 nm, L1 et L2 sont distants de  
0,4 à 0,55 nm, RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à  
1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et  
RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont  
distant de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et RL5 sont distants de  
15 0,45 à 0,75 nm, L4 et L5 sont distants de 0,4 à  
0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, et  
L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm.

2. Structure chimique ayant une affinité pour un  
20 phospholipide, caractérisée en ce qu'elle est  
constituée d'au moins une plate-forme chimique a, a',  
b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l comportant 11  
résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6, RCa1, RCa2, RCa3,  
RCa4 et RCa5 supportant un ensemble de fonctions  
25 chimiques pouvant se lier audit phospholipide appelées  
L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, et un ensemble  
de fonctions chimiques de liaison à un atome de calcium  
appelées LCa1, LCa2, LCa3, LCa4, LCa5 respectivement,  
ces fonctions chimiques RL1 à RCa5 définissant  
30 l'affinité de ladite structure pour ledit



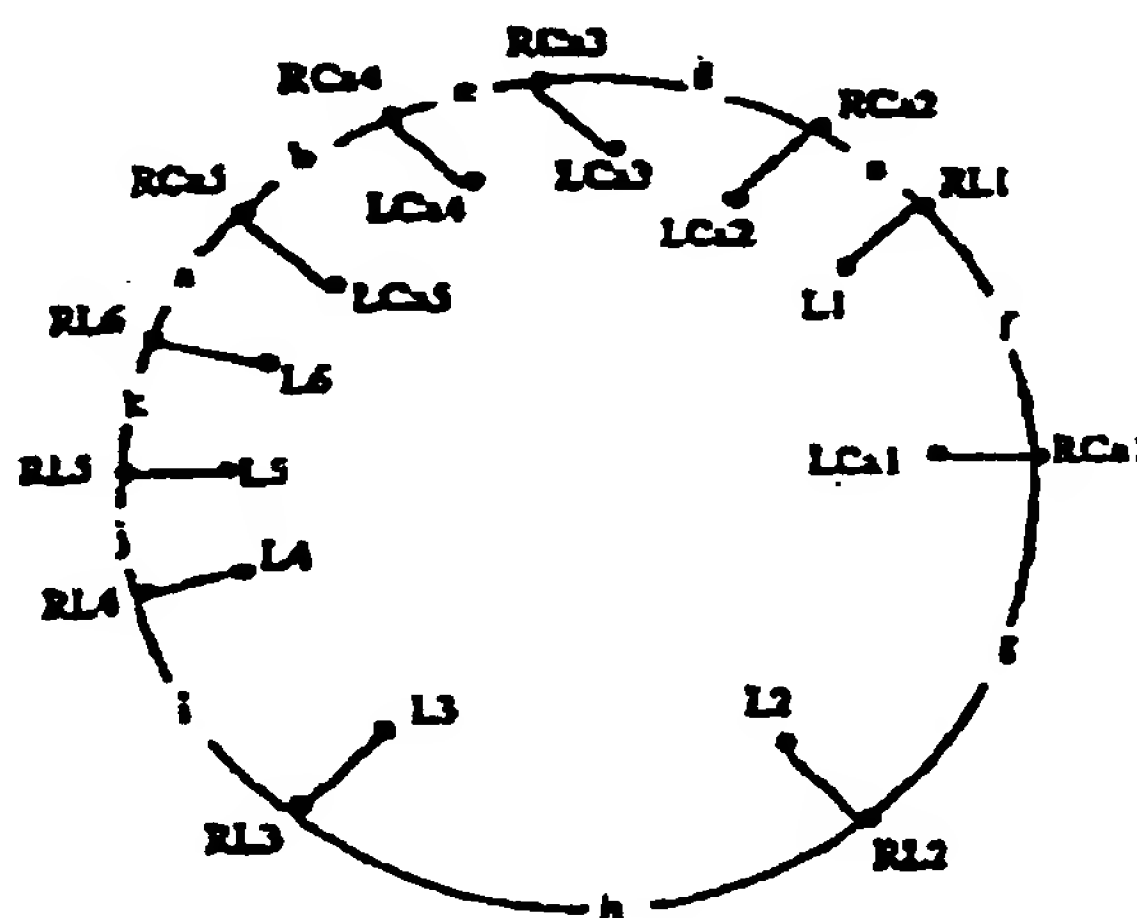


phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (IV), (V) et (VI) suivantes :



(IV)

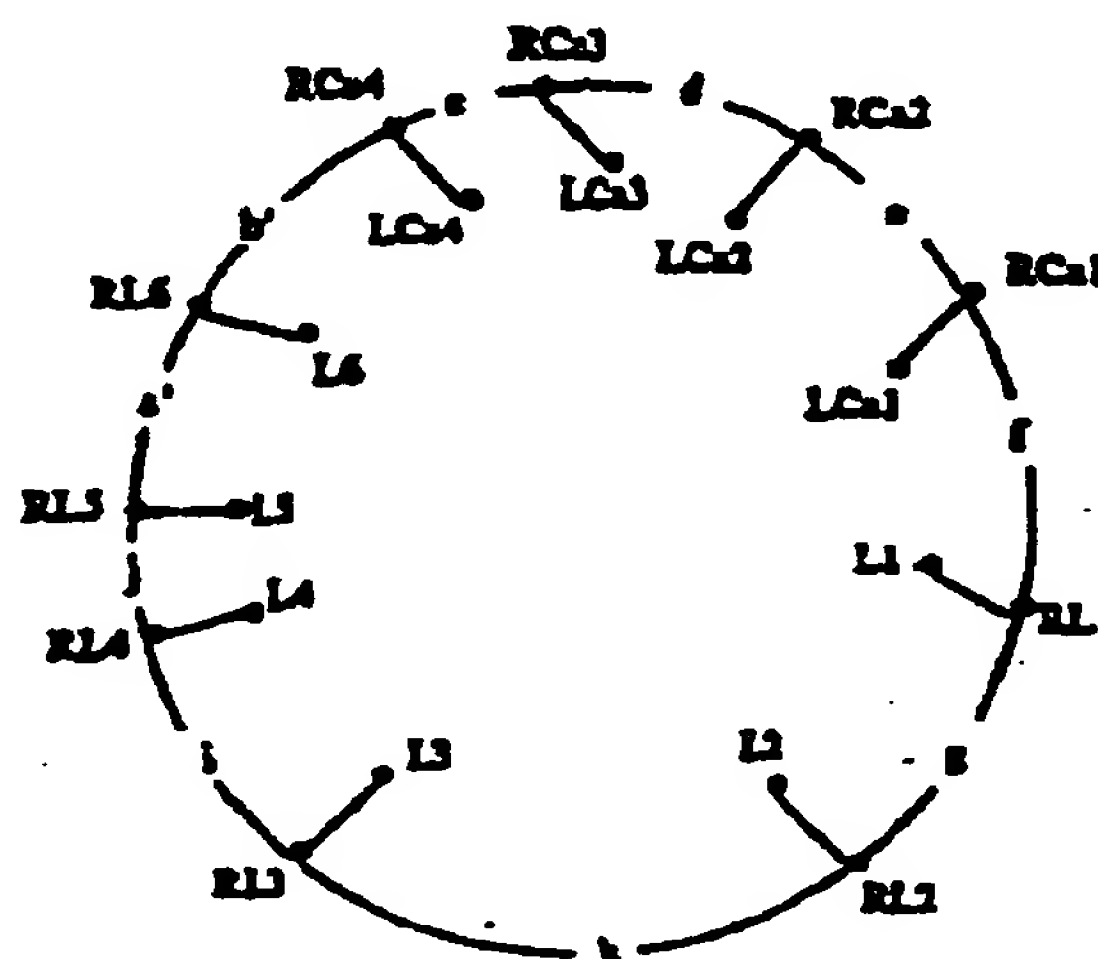
5



(V)



45



(VI)

dans lesquelles a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l sont indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel, un peptide constitué d'acides aminés naturels ou non naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s) cyclique(s) carboné(s),  
 dans lesquelles RL1 à RL6 et RCa1 à RCa5 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 et LCa1 à LCa5 respectivement, lesdites fonctions chimiques L1 à L6 comprenant soit au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, lesdites fonctions chimiques LCa1 à LCa5 comprenant un atome d'oxygène, et dans lesquelles a dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RL6 et RCa5 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa5 sont distants de 0 à 0,3 nm, b dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RCa5 et RCa4 sont distants de 0 à



0,35 nm et tel que LCa5 et LCa4 sont distants de 0,2 à 0,3 nm, b' dans la structure de construction (VI) est tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, c et d  
5 sont tels que RCa4 et RCa3 sont distants de 0,5 à 0,9 nm, LCa4 et LCa3 sont distants de 0,2 à 0,4 nm, RCa3 et RCa2 sont distants de 0,35 à 0,6 nm, et LCa3 et LCa2 sont distants de 0,22 à 0,3 nm, e, f, g, dans les structures de construction (IV), (V), (VI) sont tels  
10 que RL1 et RL2 sont distants de 0,45 à 0,65 nm, RCa1 à RCa2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, L1 et L2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm et LCa1 et LCa2 sont distants de 0,3 à 0,4 nm, h, i, j et k sont tels que RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants  
15 de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et RL5 sont distants de 0,45 à 0,75 nm, L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, et L5 et L6 sont distants de 0,4 à  
20 0,6 nm, a' dans la structure de construction (VI) est tel que RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm et tel que L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, et b' dans la structure de construction (VI) est tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4  
25 sont distants de 0 à 0,35 nm, la structure pouvant être soit fermée, soit ouverte en a et/ou en h.

3. Structure chimique selon la revendication 1, dans laquelle L1, L2, L3 et L6 présentent chacun au  
30 moins une charge positive et donneuse de liaisons



hydrogène, et L4 et L5 présentent chacun au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

4. Structure chimique selon la revendication 1,  
5 dans laquelle U, V, W, X, Y et Z sont des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 sont des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 étant les  
10 fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides aminés.

5. Structure chimique selon la revendication 1,  
dans laquelle RL1, RL2, RL3 et RL6 sont choisis  
15 indépendamment parmi Arg, Lys, Orn,  
dans laquelle RL4 est choisi indépendamment parmi Asp ou Glu, et  
dans laquelle RL5 est choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, les chaînes latérales de ces acides  
20 aminés présentant les fonctions chimiques de liaison au phospholipide L1 à L6 respectivement.

6. Structure chimique selon la revendication 3,  
dans laquelle les fonctions chimiques de liaison L1 à  
25 L6 sont directement accessibles au phospholipide chargé négativement.

7. Structure chimique selon la revendication 1,  
comportant en outre un site calcium où l'ion calcium  
30 complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide.





8. Structure chimique selon la revendication 2, dans laquelle a ou a', b ou b', c, d, e, f, g, h, i, j, k sont des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 sont des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 et LCa1 à LCa5 étant les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides aminés, et RCa1 à RCa5 étant des acides aminés naturels ou non naturels.

9. Structure chimique selon la revendication 8, dans laquelle les fonctions chimiques de liaisons L1 à L6 et les charges positives du calcium lorsqu'il est lié aux fonctions de liaison LCa1 à LCa5 sont directement accessibles au phospholipide.

10. Structure chimique selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans laquelle la plate-forme est une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine, comprenant lesdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement.

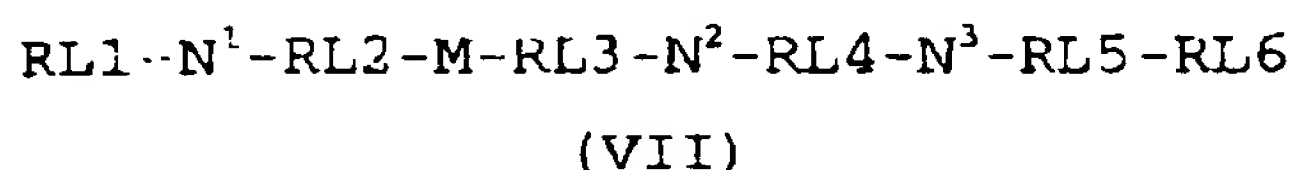
11. Structure chimique selon la revendication 10, dans laquelle le domaine de l'annexine est choisi parmi le domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, le domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, le domaine 2 de l'annexine III présenté sur la figure 6c et le domaine 1 et 2 de l'annexine IV présentés sur la figure 6d.



12. Structure chimique selon la revendication 11, dans laquelle les résidus ligands RL1 à RL6 sont respectivement soit, les résidus Arg25, Lys29, Arg63, 5 Asp68, Ser71 et Glu 72 du domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, soit les résidus Arg124, Lys128, Arg162, Asp167, Ser170 et Asp171 du domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, soit les résidus Lys100, Lys104, Lys138, Asp143, Ser146 et 10 Glu147 du domaine 2 de l'annexine III présenté sur la figure 6c, soit les résidus Arg96, Lys101, Arg135, Asp140, Ser143 et Asp144 du domaine 2 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d, soit les résidus Arg24, Lys28, Arg62, Asp67, Ser70 et Glu71 du domaine 1 de 15 l'annexine IV présenté sur la figure 6d.

13. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'une molécule de formule (VII) suivante :

20



25 dans laquelle  $N^1$  à  $N^3$  représentent chacun indépendamment de 1 à 4 acides aminés choisis indépendamment, naturels ou non naturels, et dans laquelle M est un peptide constitué de 1 à 100 acides aminés naturels ou non naturels ;

30 dans laquelle RL1, RL2, RL3 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn ; RL4 est choisi indépendamment parmi Asp ou Glu ; et RL5 est choisi



indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, ladite structure étant linéaire ou cyclique.

14. Structure selon la revendication 13, dans laquelle N<sup>1</sup> représente trois acides aminés, N<sup>2</sup> représente quatre acides aminés, et N<sup>3</sup> représente deux acides aminés.

15. Structure selon la revendication 13 ou 14, dans laquelle M est un peptide constitué de 33 acides aminés naturels ou non naturels.

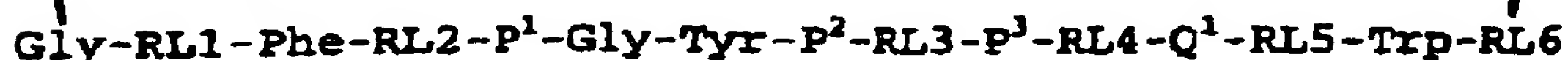
16. Structure selon la revendication 13, dans laquelle la molécule de formule (VII) est une séquence peptidique choisie parmi la séquence peptidique allant de Arg124 à Asp171 dans la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la séquence peptidique allant de Arg25 à Glu72 dans la séquence ID n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence peptidique allant de Lys100 à Glu147 dans la séquence ID n°3 présentée sur la figure 6c, la séquence allant de Arg24 à Glu71 dans la séquence ID n°4 présentée sur la figure 6d, la séquence allant de Arg96 à Asp144 dans la séquence ID n°5 présentée sur la figure 6, ou une séquence modifiée de ces séquences pourvu que RL1, RL2, RL3 et RL6 soient choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn, RL4 soit choisi indépendamment parmi Asp ou Glu, et RL5 soit choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu.

17. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend au



moins une partie d'une séquence peptidique choisie  
parmi la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la  
séquence ID n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence  
ID n°3 présentée sur la figure 6c et les séquences ID  
5 n°4 et ID n°5 présentées sur la figure 6d, ou une  
séquence modifiée de celle-ci.

18. Structure chimique ayant une affinité pour un  
phospholipide chargé négativement, caractérisée en ce  
10 qu'elle est constituée d'une séquence peptidique  
cyclique de formule (VIII) suivante :



15 dans laquelle RL1 et RL6 sont choisis indépendamment  
parmi Lys, Orn et Arg ; RL2 et RL3 sont Arg ; RL4 et  
RL5 sont choisis indépendamment parmi Asp et Glu ;  
dans laquelle  $P^1$ ,  $P^2$  et  $P^3$  sont choisis indépendamment  
parmi Ser et Thr ; dans laquelle  $Q^1$  est choisi parmi  
20 Gly et Met.

19. Structure chimique selon l'une quelconque des  
revendications 13 à 17, comprenant en outre un site  
calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue  
25 un des ligands du phospholipide chargé négativement.

20. Structure selon l'une quelconque des  
revendications précédentes, ladite structure ayant une  
affinité pour un phospholipide choisi parmi une  
30 phosphatidylsérine, une phosphatidyléthanolamine, un





phosphatidylinositol, un acide phosphatidique, et un cardiolipide.

21. Assemblage chimique ayant une affinité pour un  
5 phospholipide, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux structures chimiques définies dans les revendications 1 à 20, identiques ou différentes, lesdites structures étant liées.

10 22. Assemblage chimique selon la revendication 22, dans lequel au moins une des structures chimiques est une des structures chimiques définies dans les revendications 13 à 20.

15 23. Procédé de fabrication d'une structure chimique définie dans l'une quelconque des revendications 10 à 20 précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de préparation d'un cDNA  
20 comprenant une séquence de base codant pour ladite structure chimique, d'insertion du cDNA dans un vecteur d'expression approprié, de transformation d'une cellule hôte appropriée pour une répllication du plasmide et la fabrication de ladite structure par traduction dudit cDNA.

25

24. Procédé selon la revendication 23, dans lequel le vecteur est un plasmide.

25. Procédé selon la revendication 23, dans lequel  
30 le vecteur est le vecteur pGEX-2T.



26. Procédé selon la revendication 23, 24 ou 25, dans lequel la cellule hôte appropriée est *E. Coli*.

27. Utilisation d'une structure chimique telle que définie dans les revendications 1 à 20 pour préparer un médicament.

28. Utilisation d'un assemblage chimique tel que défini dans la revendication 21 ou 22 pour préparer un médicament.

29. Utilisation selon la revendication 27 ou 28, dans laquelle le médicament est choisi parmi un médicament destiné au traitement d'une thrombose, un médicament destiné au traitement d'une tumeur, un médicament ayant une action anti-inflammatoire.

30. Utilisation d'une structure telle que définie dans les revendications 1 à 19 pour la fabrication d'un matériau de recouvrement d'un biomatériau thrombogène.

31. Composé de marquage caractérisé en ce qu'il comprend une structure telle que définie dans les revendications 1 à 20 couplée à une molécule de marquage.

32. Composé de marquage caractérisé en ce qu'il comprend un assemblage tel que défini dans la revendication 21 ou 22 couplé à une molécule de marquage.



33. Composé selon la revendication 31 ou 32 dans lequel la molécule de marquage est choisie parmi une molécule fluorescente, le complexe avidine-biotine, un radioélément, et un composé paramagnétique.

5

34. Trousse de diagnostic comprenant un composé selon l'une quelconque des revendications 31 à 32.

10 35. Trousse de diagnostic selon la revendication 34, comprenant en outre un réactif adéquat permettant de détecter ladite molécule de marquage.

15 36. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure selon l'une quelconque des revendications 1 à 20 couplée à un marqueur.

20 37. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend un assemblage selon la revendication 21 ou 22 couplé à un marqueur.

25 38. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure selon l'une quelconque des revendications 1 à 20 couplée à un marqueur.

30 39. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend un assemblage selon la revendication 21 ou 22 couplé à un marqueur.





## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>C07K 14/47, A61K 38/17, G01N 33/58, 33/86</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/20453</b>
		(43) Date de publication internationale: 13 avril 2000 (13.04.00)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02329

(22) Date de dépôt international: 30 septembre 1999 (30.09.99)

(30) Données relatives à la priorité:  
98/12366 2 octobre 1998 (02.10.98) FR

(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR). UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI) [FR/FR]; 4, place Jussieu, Tour Centrale, F-75252 Paris Cedex 05 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SANSON, Alain [FR/FR]; 2, avenue de la Villeneuve, F-91940 Gometz le Chatel (FR). RUSSO-MARIE, Françoise [FR/FR]; 105, rue des Bruyères, F-92310 Sèvres (FR). NEUMANN, Jean-Michel [FR/FR]; Bât.2 Les Quinconces, F-91190 Gif sur Yvette (FR). CORDIER-OCHSENBEIN, Françoise [FR/FR]; 12, rues des Patriarches, F-75005 Paris (FR). GUEROIS, Raphael [FR/FR]; 12, rue des Patriarches, F-75005 Paris (FR).

(74) Mandataire: DES TERMES, Monique; Brevatome, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: CHEMICAL STRUCTURE WITH AFFINITY FOR A PHOSPHOLIPID, AND MARKER COMPOUND, DIAGNOSIS KIT, AND MEDICINE COMPRISING SAID STRUCTURE

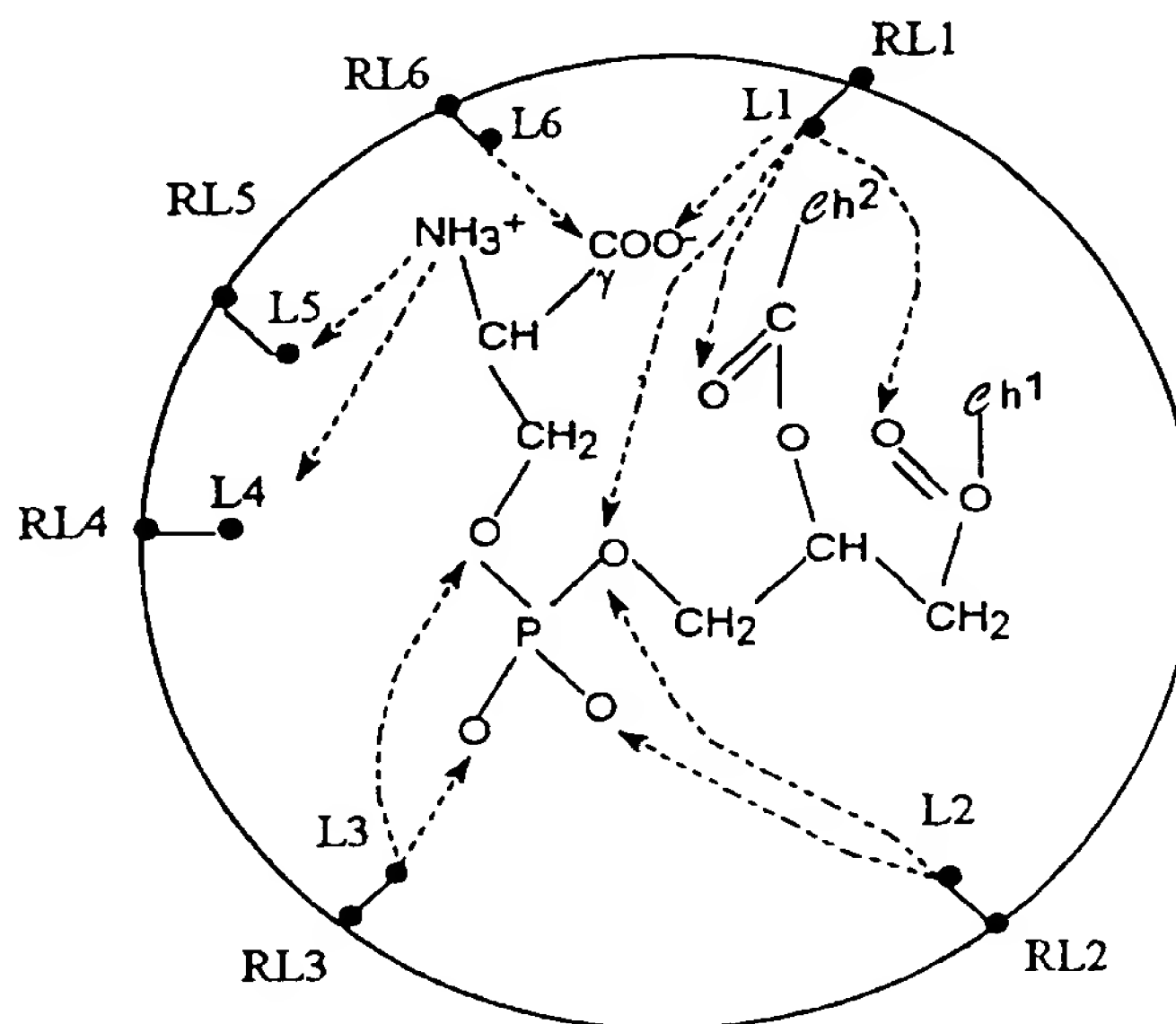
(54) Titre: STRUCTURE CHIMIQUE AYANT UNE AFFINITE POUR UN PHOSPHOLIPIDE, ET COMPOSE DE MARQUAGE, TROUSSE DE DIAGNOSTIC, ET MEDICAMENT COMPRENANT CETTE STRUCTURE

## (57) Abstract

The invention concerns a compound with affinity for a negatively charged phospholipid and a detection molecule, a conjugate and a pharmaceutical composition containing said compound. Generally speaking, the compound of the invention is useful for specific recognition of lipid vectors and can be used for engineering and preparing compounds for identifying and sequestering negatively charged lipids, such as phosphatidyl serine and phosphatidic acid. Said chemical structure may have the construct (I).

## (57) Abrégé

La présente invention se rapporte à un composé ayant une affinité pour un phospholipide chargé négativement ainsi qu'à une molécule de détection, à un conjugué et à une composition pharmaceutique comprenant ledit composé. De manière générale, le composé de la présente invention est utile pour la reconnaissance spécifique de vecteurs lipidiques. Il est utilisable pour l'ingénierie et la création de composés de reconnaissance et de séquestration de lipides chargés négativement, tels que la phosphatidyle sérine et l'acide phosphatidique. La structure chimique de la présente invention peut avoir la construction (I).



Composé (I) + phosphatidylsérine

COMPOUND (I) + PHOSPHATIDYLSERINE

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						



**STRUCTURE CHIMIQUE AYANT UNE AFFINITE POUR UN  
PHOSPHOLIPIDE, ET COMPOSE DE  
MARQUAGE, TROUSSE DE DIAGNOSTIC, ET MEDICAMENT  
COMPRENANT CETTE STRUCTURE**

5

**DESCRIPTION**

**Domaine technique**

La présente invention se rapporte à une structure  
10 chimique ayant une affinité pour un phospholipide ainsi  
qu'à une molécule de détection, à un conjugué et à une  
composition pharmaceutique comprenant ladite structure.

De manière générale, la structure chimique de la  
présente invention est utile pour la reconnaissance  
15 spécifique de vecteurs lipidiques. Elle est utilisable  
pour l'ingénierie et la création de composés de  
reconnaissance et de séquestration de lipides notamment  
de lipides chargés négativement, tels que la  
phosphatidylsérine et/ou l'acide phosphatidique.

20 Ces lipides jouent un rôle important notamment  
dans la signalisation cellulaire et peuvent être  
présents à la surface externe des membranes des  
cellules et/ou circuler dans le milieu sanguin à la  
suite d'événements pathologiques très divers.

25 Divers événements cellulaires aboutissent à  
l'apparition de phosphatidylsérine (PS) à la surface  
externe des cellules, ces événements peuvent résulter  
soit d'une altération fortuite ou pathologique de la  
cellule, soit d'un événement cellulaire programmé telle  
30 que la mort cellulaire ou apoptose. L'apparition de PS  
à la surface externe des cellules constitue donc un  
"message primaire" important témoignant de l'existence  
d'un dysfonctionnement. Dans le cas du processus de

coagulation sanguine, le mécanisme est bien décrit :  
l'altération des cellules endothéliales des vaisseaux  
sanguins, soit pour des raisons accidentelles, soit  
pour des raisons pathologiques plus complexes, provoque  
5 l'apparition de ce message PS à la surface externe des  
cellules en contact avec le milieu sanguin. Ce message  
est immédiatement reconnu par certaines protéines  
circulantes qui déclenchent alors une cascade  
d'événements aboutissant au phénomène de coagulation  
10 sanguine bien connu.

L'invention tire profit de la propriété de la  
structure qu'elle fournit de se lier, en présence ou  
non de calcium, aux lipides et notamment ceux chargés  
négativement, pour la mise en point de composés  
15 utilisables comme outils de recherche, de diagnostic et  
de thérapeutique dans le domaine de la reconnaissance  
des effecteurs lipidiques en général et de la détection  
de l'apoptose, des troubles de la coagulation sanguine,  
du choc septique et des pathologies inflammatoires  
20 aiguës en particulier.

Concernant la recherche et le diagnostic, la  
structure de l'invention peut par exemple être couplée  
à des molécules de détection, par exemple à une  
molécule fluorescente, au complexe avidine-biotine, à  
25 un radioélément à vie courte, ou à un composé  
paramagnétique. Avec ces molécules de détection, il est  
possible par exemple de détecter des cellules  
apoptotiques ou de reconnaître des microdomaines  
membranaires chargés négativement.

30 La structure de la présente invention peut donc  
être utilisée pour une détection "in vitro" de  
pathologies impliquant l'apparition de charges

negatives à la surface des cellules et la libération dans le sang de microvésicules.

La structure de la présente invention peut également être utilisée lorsqu'elle est couplée par exemple à un radioélément à vie courte, pour une détection "in vivo" de zones thrombotiques lors d'accidents vasculaires de toute sorte, en particulier cérébraux, en utilisant des systèmes d'imagerie. Cette structure peut par ailleurs être utilisée lorsqu'elle est couplée à un composé paramagnétique tel qu'un complexe gadolinium pour une détection "in vivo" de zones thrombotiques, en particulier cérébrales, en utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Concernant la thérapeutique, de manière générale, la structure de la présente invention peut être utilisée seule ou couplée à une molécule thérapeutique pour préparer un médicament utilisable par exemple par voie orale. Un tel médicament peut par exemple être utilisé pour le ciblage de cette molécule vers des zones présentant des charges négatives telles que des tumeurs présentant des foyers de cellules apoptotiques ou des tumeurs inflammatoires.

La structure de la présente invention peut par exemple être couplée à des molécules à action thrombolytique pour préparer un médicament qui peut être utilisé par exemple par voie orale en tant qu'anti-coagulant dans le traitement et la prophylaxie de la thrombose, ou pour préparer une molécule recouvrant tous les biomatériaux thrombogènes. La structure de la présente invention peut donc être utilisée pour le ciblage des molécules thrombolytiques au site du thrombus ou vers les zones thrombogènes.

Dans un autre exemple d'application de la présente invention, la structure de l'invention peut être seule ou couplée à une molécule anti-inflammatoire pour préparer un médicament qui peut être utilisé par voie  
5 orale, par exemple dans des pathologies aiguës comme l'asthme, la rectocolite hémorragique (RCH), le Crohn, le choc septique, les maladie du collagène et de l'arthrite.

#### 10 **Etat de la technique**

Une famille de protéines, appelées annexines, ont été décrites dans l'art antérieur comme présentant un ancrage fonctionnel réversible à la membrane cellulaire, régulé par la concentration en calcium et  
15 la présence de phospholipides anioniques. Les annexines constituent une famille de protéines exprimées dans des tissus très divers, aussi bien chez les animaux que chez les plantes. Il semble qu'elles ne sont ni exprimées chez la bactérie, ni chez la levure.

20 La structure des annexines comporte quatre domaines d'environ 70 acides aminés, ou résidus, très moyennement homologues en séquence mais de topologie quasiment identique.

La figure 1A en annexe est un schéma de la  
25 topologie générale d'une annexine et la figure 1B en annexe est un schéma de la topologie d'un domaine de l'annexine portant un site calcium. Sur la figure 1A, C représente l'extrémité C-terminale de cette protéine, N représente l'extrémité N-terminale de cette protéine.  
30 Les domaines, notés D1 à D4, sont associés en deux modules, l'un covalent D2D3, l'autre non covalent D1D4. Sur la figure 1B, A représente une première hélice  $\alpha$ , B représente une deuxième hélice  $\alpha$ , C représente une

troisième hélice  $\alpha$ , D représente une quatrième hélice  $\alpha$ , E représente une cinquième hélice  $\alpha$ , et Ca représente l'atome de calcium. L'association de ces hélices constitue la structure consensus pour un  
5 domaine d'annexine.

A l'heure actuelle, leurs rôles biologiques demeurent encore mal définis.

Dans le document WO 92/19279, J. TAIT décrit des conjugués ayant une affinité pour des phospholipides.  
10 Il décrit en particulier l'utilisation de l'annexine, en particulier de l'annexine V, pour fabriquer un conjugué actif utilisable en tant qu'agent thrombolytique.

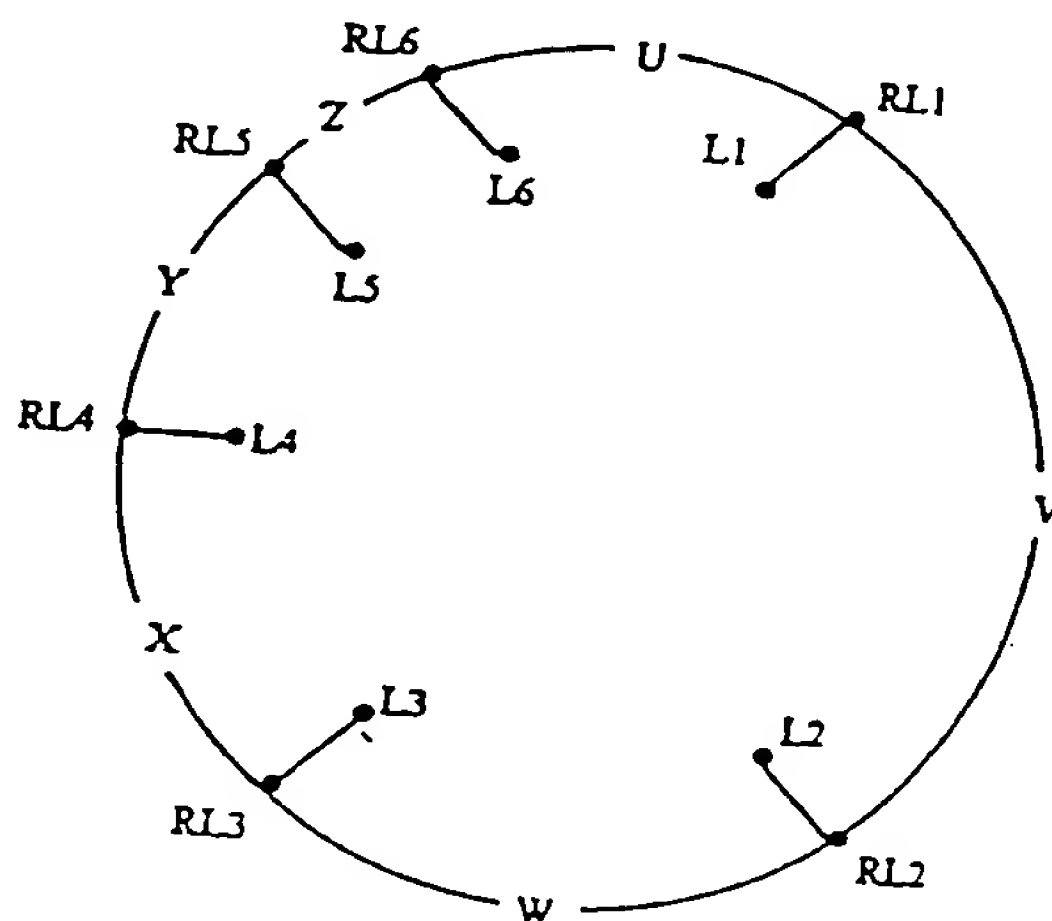
Malheureusement, le conjugué décrit dans ce  
15 document est préparé à partir de l'annexine entière par un procédé de recombinaison génétique. De ce fait, il apparaît de nombreux inconvénients qui sont notamment un rendement faible, un coût de fabrication élevé, et l'obtention d'un conjugué fragile du fait de sa partie  
20 protéique complexe.

### **Exposé de l'invention**

La présente invention a précisément pour but de fournir une structure chimique ayant une affinité  
25 spécifique avec un phospholipide. La structure chimique de l'invention présente notamment l'avantage d'être stable chimiquement et de pouvoir être fabriquée de manière reproductible, avec un rendement élevé et un coût de fabrication très réduit par rapport aux  
30 composés de l'art antérieur.

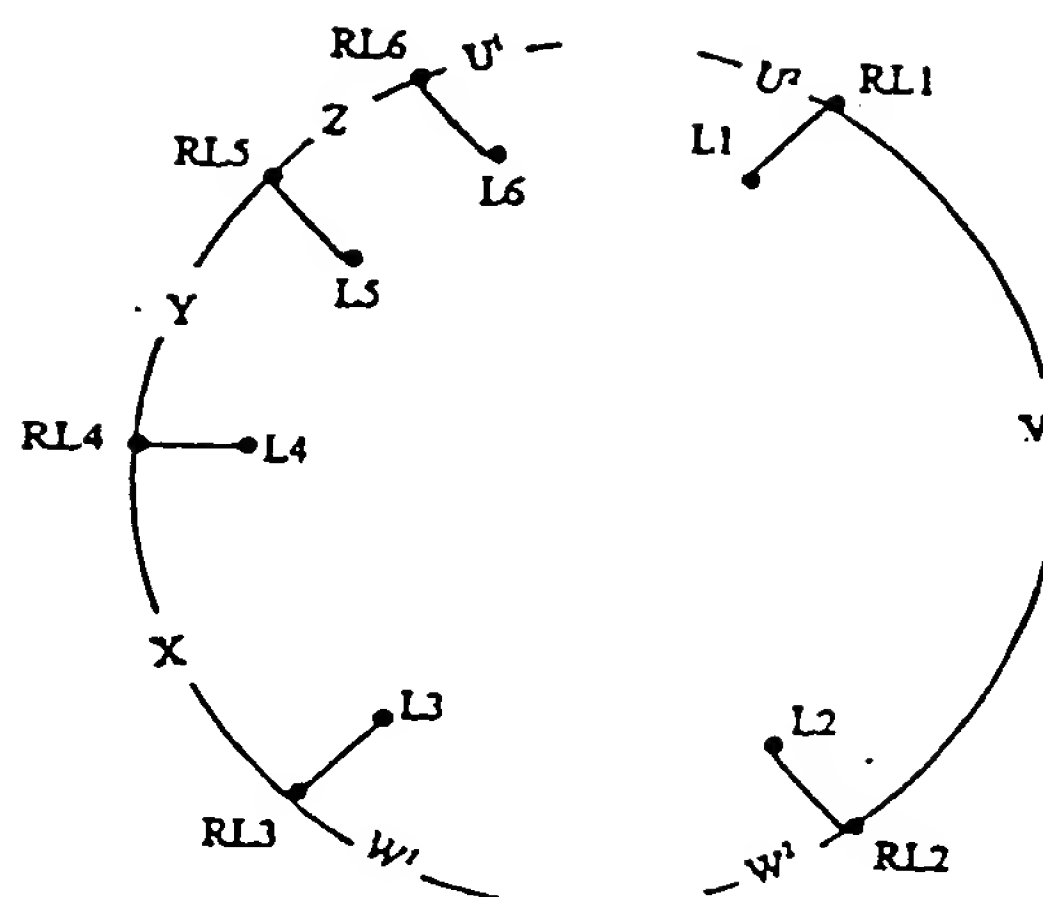
La structure de la présente invention se caractérise en ce qu'elle comprend au moins une plate-forme chimique U, V, W, X, Y comportant six résidus

RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6 supportant un ensemble de fonctions chimiques pouvant se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, ces fonctions chimiques définissant au moins en partie  
5 l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (I), (II) et (III) suivantes :

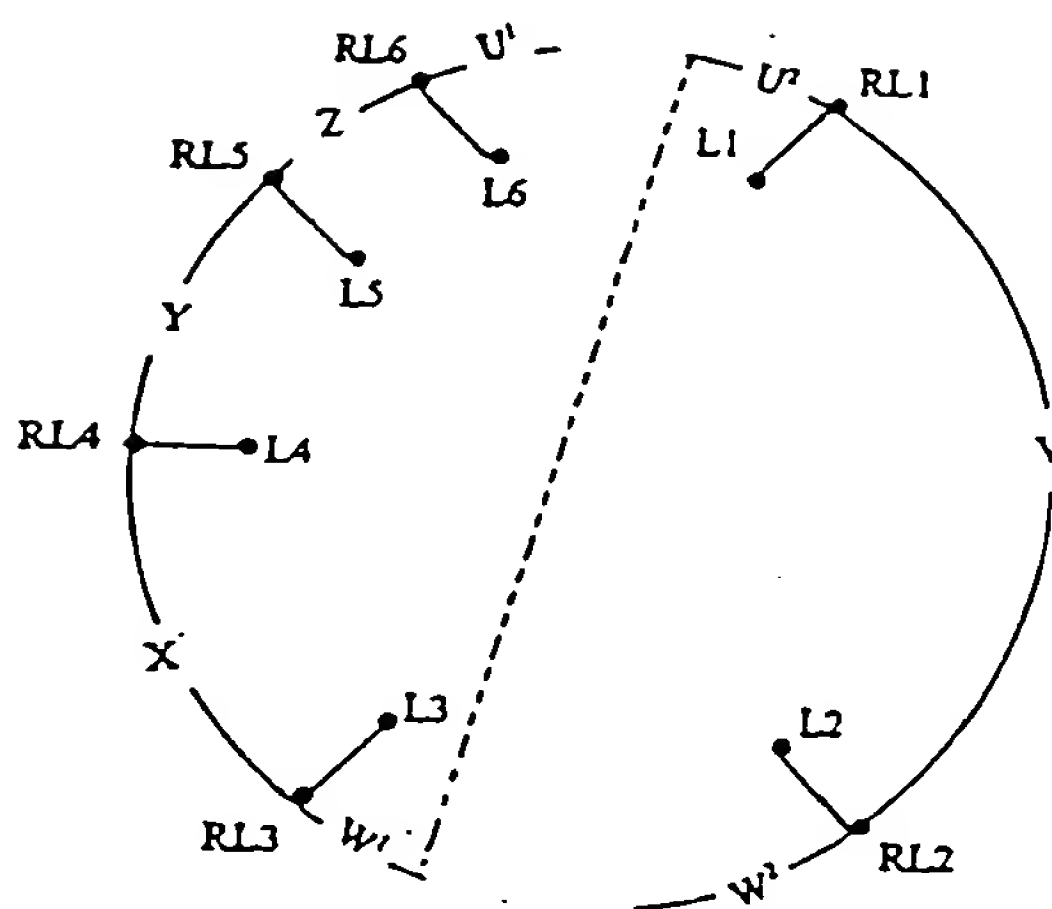


(I)

7



(II)



(III)

5

dans lesquelles  $U$ ,  $U^1$ ,  $U^2$ ,  $V$ ,  $W$ ,  $W^1$ ,  $W^2$ ,  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$  sont  
indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel,  
un peptide constitués d'acides aminés naturels ou non  
naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s)  
10 cyclique(s) carboné(s),



dans lesquelles RL1 à RL6 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement, lesdites fonctions chimiques comprenant soit au moins une charge positive et  
5 donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, et dans lesquelles U, U<sup>1</sup>, U<sup>2</sup>, V, W, X, Y et Z sont tels que RL6 et RL1 sont distants de 0,65 à 0,95 nm, L6 et L1 sont distants de 0,65 à 0,9 nm, RL1 et RL2 sont  
10 distants de 0,45 à 0,65 nm, L1 et L2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et RL5 sont distants de  
15 0,45 à 0,75 nm et L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II) ou (III), L1, L2, L3 et L6  
20 peuvent présenter chacune au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, et L4 et L5 peuvent présenter chacune au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II) ou (III), U, V, W, X, Y et Z  
25 peuvent être des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 sont des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci,  
30 L1 à L6 étant les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides aminés.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II) ou (III), RL1 à RL6 peuvent être

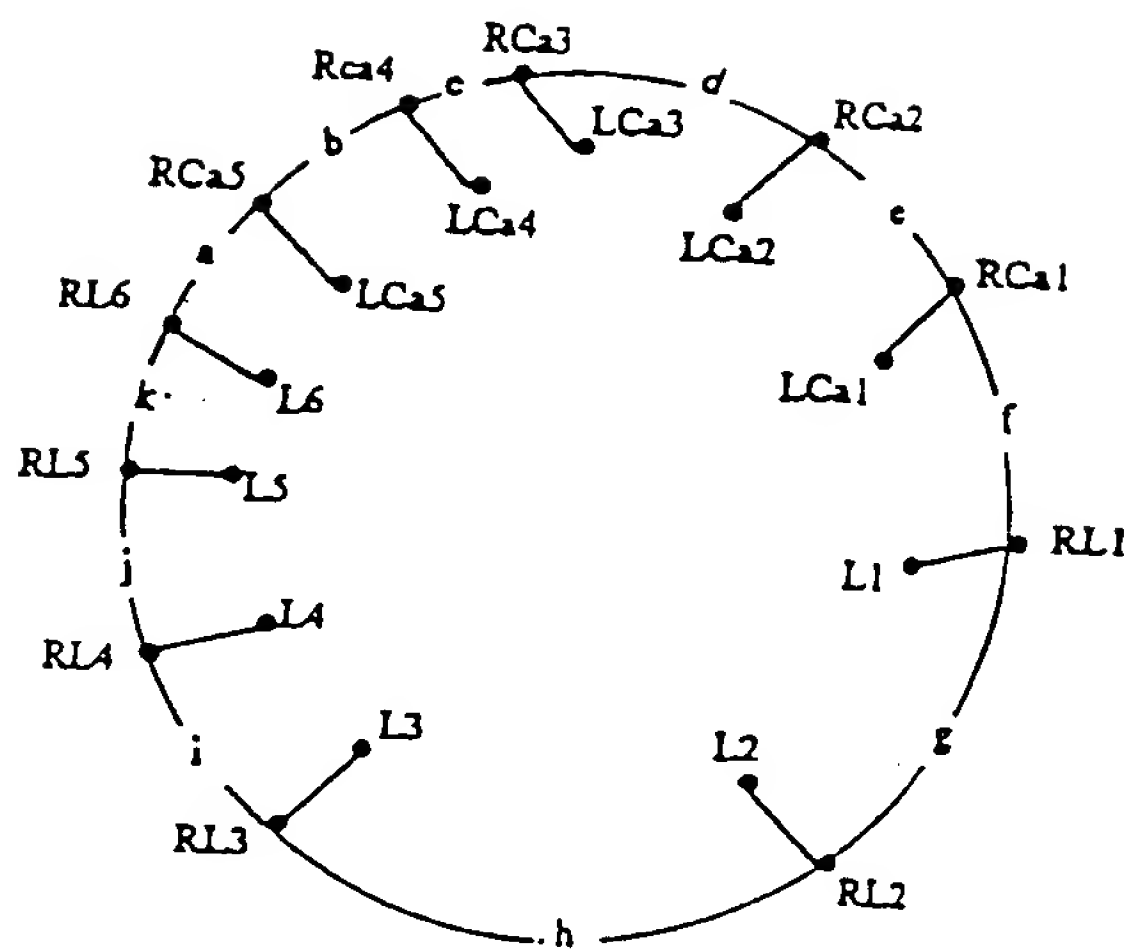


disposés dans l'espace formé par U, V, W, X, Y, Z de manière à ce que les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement de leur chaîne latérales soient directement accessibles au phospholipide.

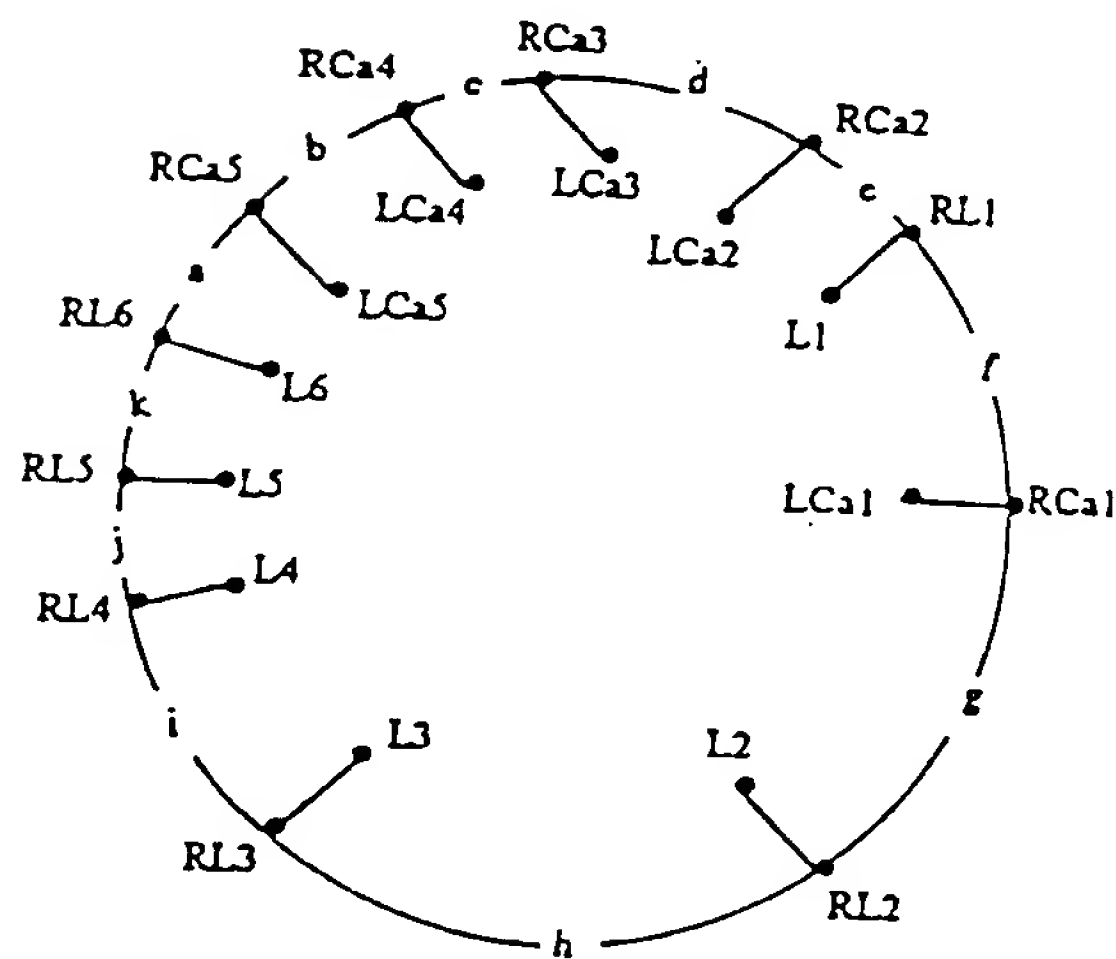
5        Selon l'invention, la structure de construction (I), (II) ou (III) peuvent comprendre en outre un site calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide.

10        La présente invention fournit également une structure chimique qui est caractérisé en ce qu'elle comprend au moins une plate-forme chimique a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l comportant 11 résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6, RCa1, RCa2, RCa3, RCa4 et RCa5 supportant un ensemble de fonctions chimiques  
15        pouvant se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, et un ensemble de fonctions chimiques de liaison à un atome de calcium appelées LCa1, LCa2, LCa3, LCa4, LCa5 respectivement, ces fonctions chimiques RL1 à RCa5 définissant au moins  
20        en partie l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (IV), (V) et (VI) suivantes :

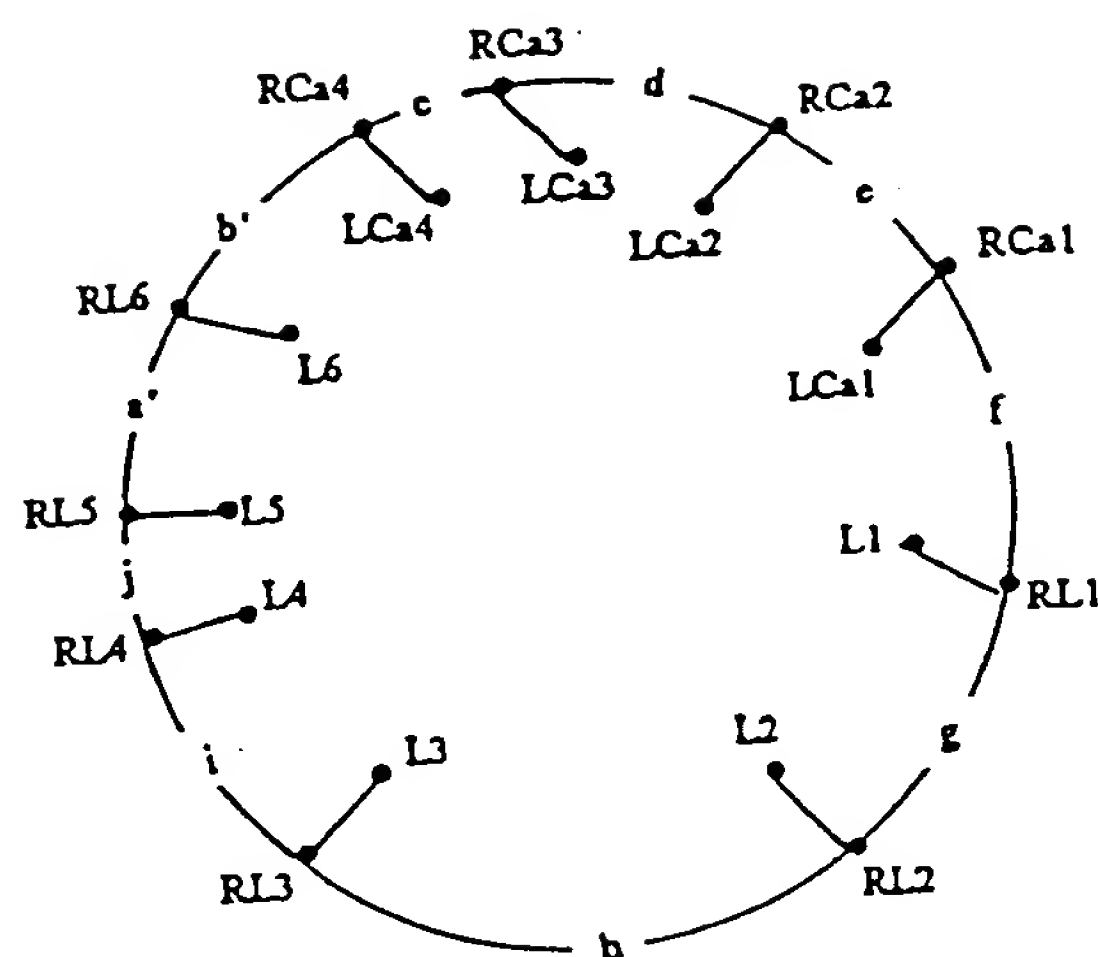
10



(IV)



(V)



(VI)

dans lesquelles a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l sont indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel, un peptide constitué d'acides aminés naturels ou non naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s) cyclique(s) carboné(s),  
 dans lequel RL1 à RL6 et RCa1 à RCa5 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 et LCa1 à LCa5 respectivement, lesdites fonctions chimiques L1 à L6 comprenant soit au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, lesdites fonctions chimiques LCa1 à LCa5 comprenant un atome d'oxygène, et  
 dans lesquelles a dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RL6 et RCa5 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa5 sont distants de 0 à 0,3 nm, b dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RCa5 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que LCa5 et LCa4 sont distants de 0,2 à

0,3 nm, b' dans la structure de construction (VI) est tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, c et d sont tels que RCa4 et RCa3 sont distants de 0,5 à 0,9 nm, LCa4 et LCa3 sont distants de 0,2 à 0,4 nm, RCa3 et RCa2 sont distants de 0,35 à 0,6 nm, et LCa3 et LCa2 sont distants de 0,22 à 0,3 nm, e, f, g, dans les structures de construction (IV), (V), (VI) sont tels que RL1 et RL2 sont distants de 0,45 à 0,65 nm, RCa1 à RCa2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, L1 et L2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm et LCa1 et LCa2 sont distants de 0,3 à 0,4 nm, h, i, j et k sont tels que RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et RL5 sont distants de 0,45 à 0,75 nm, L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, et L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, a' dans la structure de construction (VI) est tel que RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm et tel que L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, et b' dans la structure de construction (VI) est tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, la structure pouvant être soit fermée, soit ouverte au niveau de a et/ou de h.

Lorsque les distances précédentes a, b, b' sont indiquées comme pouvant être nulles, on sous-entend que les deux ensembles (RL6-L6 et Rca5-Lca5) et/ou les deux ensembles (Rca4-Lca4 et Rca5-Lca5) et/ou les deux ensembles (RL6-L6 et Rca4-Lca4) constituent séparément un seul et même ensemble.

Les plates-formes selon l'invention sont constituées d'un ensemble de groupes chimiques

structuraux pouvant comprendre un nombre de groupes cycliques suffisants pour assurer une rigidité compatible avec l'affinité au phospholipide.

Les distances mesurées lorsque les RL et les RCa sont des acides aminés, peuvent être mesurées entre les carbones  $\alpha$  de ces acides aminés dans les structures (I) à (VI) précitées.

Ces structures peuvent être synthétisées par les procédés classiques de synthèse de la chimie organique et de la chimie des protéines, par recombinaison génétique, par génie génétique, etc...

Des exemples de telles structures sont données notamment dans "Discovery of Sequence-Selective Peptide Binding by Synthetic Receptors Using Encoded Combinatorial Libraries", W.C. Still, Acc. Chem. Res., 1996, 29, 155-163 et dans "Toward Synthetic Adrenaline Receptors : Strong, Selective and Biomimetic Recognition of Biologically Active Amino Alcohols by Bisphosphonate Receptors Molecules", T. Shrader, J. Org. Chem., 1998, 63, 264-272.

Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), L1, L2, L3 et L6 peuvent présenter chacune au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, et L4, L5, LCa5, LCa4, LCa3, LCa2 et LCa1 peuvent présenter chacune au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II), (III), (IV), (V) ou (VI), RL1, RL2, RL3 et RL6 peuvent être choisis indépendamment parmi Arg, Lys, Orn ; RL4 peut être choisi indépendamment parmi Asp ou Glu ; et RL5 peut être choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, les

chaînes latérales de ces acides aminés présentant les fonctions chimiques de liaison au phospholipides L1 à L6 respectivement.

Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), a ou a', b ou b', c, d, e, f, g, h, i, j, k peuvent être des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 peuvent être des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 et LCa1 à LCa5 peuvent être les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides aminés, et RCa1 à RCa5 peuvent être des acides aminés naturels ou non naturels.

Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), les carbones RL1 à RL6 et RCa1 à RCa2 peuvent être disposés dans l'espace formé par a, b, c, d, e, f, g, h, i, j et k de manière à ce que les fonctions chimiques de liaisons L1 à L6 respectivement et les charges positives du calcium lorsque ce dernier est lié aux fonctions de liaison LCa1 à LCa5 soient directement accessibles au phospholipide.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II), (III), (IV), (V) ou (VI), au moins une partie de la plate-forme peut être une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine, comprenant au moins un desdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement de liaison au phospholipide.

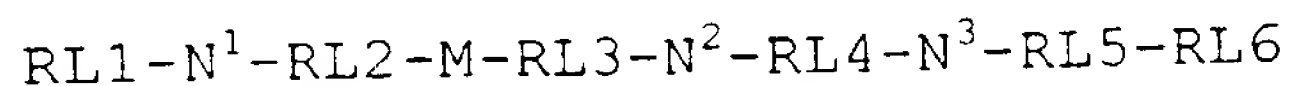
Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II), (III), (IV), (V) ou (VI), la plate-forme peut être une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine,

ladite partie du domaine de l'annexine comprenant lesdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement.

Selon l'invention, le domaine de l'annexine est  
5 choisi parmi le domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, le domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, le domaine 2 de l'annexine III présenté sur la figure 6c et le domaine 1 et 2 de l'annexine IV présentés sur la figure 6d.

10 Selon l'invention, les résidus ligands RL1 à RL6 peuvent être respectivement soit, les résidus Arg25, Lys29, Arg63, Asp68, Ser71 et Glu 72 du domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, soit les résidus Arg124, Lys128, Arg162, Asp167, Ser170 et  
15 Asp171 du domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, soit les résidus Lys100, Lys104, Lys138, Asp143, Ser146 et Glu147 du domaine 2 de l'annexine III présenté sur la figure 6c, soit les résidus Arg97, Lys101, Arg135, Asp140, Ser143 et Asp144 du domaine 2  
20 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d, soit les résidus Arg24, Lys28, Arg62, Asp67, Ser70 et Glu71 du domaine 1 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d.

La présente invention fournit également une structure chimique ayant une affinité pour un  
25 phospholipide caractérisée en ce qu'elle comprend une molécule de formule (VII) suivante :



(VII)

30

dans laquelle  $N^1$  à  $N^3$  représentent chacun indépendamment de 1 à 4 des acides aminés choisis indépendamment, naturels ou non naturels, et dans laquelle M est un

peptide constitué de 1 à 100 acides aminés naturels ou non naturels ;

dans laquelle RL1, RL2, RL3 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn ; RL4 est choisi  
5 indépendamment parmi Asp ou Glu ; et RL5 est choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, ladite structure étant linéaire ou cyclique.

Selon l'invention, N<sup>1</sup> peut représenter trois acides aminés, N<sup>2</sup> peut représenter quatre acides  
10 aminés, et N<sup>3</sup> peut représenter deux acides aminés dans la structure de formule VII.

Dans la structure selon l'invention, M peut être par exemple un peptide constitué de 33 acides aminés naturels ou non naturels.

15 Selon l'invention, la structure de formule (VII) peut être une séquence peptidique choisie parmi la séquence peptidique allant de Arg124 à Ser171 dans la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la séquence peptidique allant de Arg25 à Glu72 dans la séquence ID  
20 n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence peptidique allant de Lys100 à Glu147 dans la séquence ID n°3 présentée sur la figure 6c, la séquence allant de Arg24 à Glu71 dans la séquence ID n°4 présentée sur la figure 6d, la séquence allant de Arg97 à Asp144 dans la  
25 séquence ID n°5 présentée sur la figure 6d, ou une séquence modifiée de ces séquences pourvu que RL1, RL2, RL3 et RL6 soient choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn ;

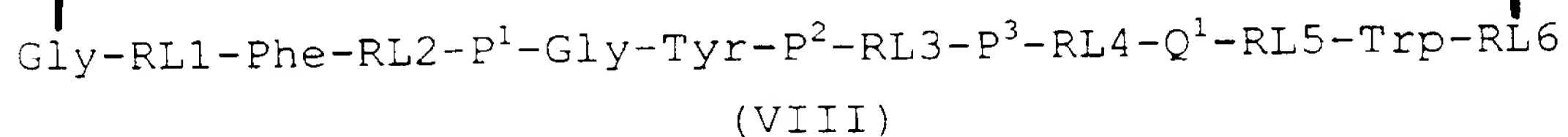
RL4 choisi indépendamment parmi Asp ou Glu, et RL5 est  
30 choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu.

La présente invention fournit également une structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, comprenant au moins une partie d'une



séquence peptidique choisie parmi la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la séquence ID n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence ID n°3 présentée sur la figure 6c, et les séquences ID n°4 et ID n°5 présentées sur la figure 6d, ou une séquence modifiée de celle-ci.

La présente invention fournit également une structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide chargé négativement, comprenant une séquence peptidique cyclique de formule (VIII) suivante :



15

dans laquelle RL1 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Lys, Orn et Arg ; RL2 et RL3 sont Arg ; RL4 et RL5 sont choisis indépendamment parmi Asp et Glu ; dans laquelle P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> et P<sup>3</sup> sont choisis indépendamment parmi Ser et Thr ; dans laquelle Q<sup>1</sup> est choisi parmi Gly et Met.

Les structures chimiques précitées peuvent comprendre en outre un site calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide chargé négativement. Le site calcium peut être par exemple un site calcium analogue à celui des annexines ou des phospholipides A2. Ces sites calcium sont connus par l'homme du métier.

Selon l'invention, toutes les structures chimiques précitées peuvent avoir une affinité pour un phospholipide choisi parmi une phosphatidylsérine, une phosphatidyléthanolamine, une phosphatidylinositol, un acide phosphatidique, et un cardiolipide, la ou les

chaîne(s) lipidique(s) des phospholipides peuvent par exemple comprendre de 4 à 23 atomes de carbone. Par exemple, le phospholipide peut posséder une chaîne d'acide arachidonique, par exemple pour la  
5 phosphatidylsérine.

La présente invention fournit également un assemblage chimique ayant une affinité pour un phospholipide, comprenant au moins deux des structures chimiques de la présente invention, identiques ou  
10 différentes, lesdites structures étant liées.

Par exemple, dans un assemblage chimique de la présente invention, au moins une des structures chimiques peut être une des structures chimiques peptidiques précédemment décrites.

15 Les assemblages selon l'invention peuvent donc être composés par exemple de structures identiques ou différentes. Par exemple, l'assemblage peut être un assemblage covalent convenable de deux structures selon l'invention, par exemple des domaines 1 et 4 selon  
20 l'invention d'une même annexine. Cet assemblage peut par exemple comporter un domaine 4 selon l'invention modifié par génie génétique dans le but d'introduire un site calcium et phospholipidique identique à celui du domaine 1 de l'invention.

25 Ces domaines peuvent par exemple provenir des annexines I et V.

Ces assemblages peuvent avoir notamment pour but d'augmenter l'affinité des structures de la présente invention, pour le phospholipide, par exemple pour un  
30 phospholipide chargé négativement. Ils peuvent être réalisés par exemple par insertion d'un lien peptidique flexible, par exemple poly-glycine, entre les structures chimiques de l'invention.

Les structures et assemblages de la présente invention présentent une affinité pour les phospholipides, et notamment pour ceux chargés négativement, meilleure que 0,1  $\mu$ M. Ils peuvent  
5 comprendre une partie d'une annexine ou l'un de ses dérivés. Cette annexine peut être une annexine naturelle ou modifiée par les moyens classiques de la chimie ou du génie génétique.

La présente invention fournit également un procédé  
10 de fabrication d'une structure chimique comprenant les étapes de préparation d'un cDNA comprenant une séquence de base codant pour ladite structure chimique, d'insertion du cDNA dans un vecteur d'expression approprié, de transformation d'une cellule hôte  
15 appropriée pour une répllication du plasmide et la fabrication de ladite structure par traduction dudit cDNA.

Selon l'invention, dans ce procédé, le vecteur peut être un plasmide, par exemple le vecteur pGEX-2T.

20 Dans le procédé selon l'invention, la cellule hôte appropriée peut être par exemple *E. Coli*.

Par exemple, pour la fabrication de la structure selon l'invention, on peut partir du domaine 1 de l'annexine I et modifier la séquence de telle manière  
25 que les résidus RL définis précédemment et éventuellement les résidus RCa apparaissent dans la séquence. Ainsi, par des procédés classiques de génie génétique, on peut fabriquer un cDNA codant pour la séquence modifiée et obtenir très facilement la  
30 structure de la présente invention. La structure selon l'invention, lorsqu'elle présente au moins une partie peptidique peut également être fabriquée par un procédé classique de synthèse chimique en phase solide.

Un exemple de modification de la séquence du domaine 1 de l'invention de l'annexine I peut consister à remplacer His52 par Arg, Met56 par Lys ou Arg, Val57 par Gly, Val60 par Thr, éventuellement Lys90 par Arg, 5 Thr95 par Asp, Lys98 par Ser ou Thr, et Ala99 par Asp ou Glu. Ces modifications peuvent être faites sur d'autres domaines également.

Ces modifications peuvent avoir notamment pour rôle d'augmenter la stabilité générale de la structure 10 ou du domaine vis-à-vis de la température, du pH, et des conditions ioniques du milieu d'utilisation ; de diminuer ses propriétés éventuelles de toxicité générale envers l'organisme humain ; d'augmenter son affinité pour les phospholipides chargés négativement ; 15 et d'augmenter son affinité générale pour les membranes cellulaires.

Selon l'invention, la modification d'un domaine peut également avoir pour rôle de développer l'affinité de la structure pour un phospholipide, par exemple 20 chargé négativement ; et même de retrouver une affinité au moins égale à celle que possède l'annexine dite sauvage, en l'absence de calcium.

La modification peut par exemple porter sur le résidu dit résidu bidentate Asp ou Glu de calcium (RL6) 25 du ou des domaines portant un site phosphatidylsérine, pour les remplacer par l'un des résidus Lys ou Orn.

Une autre modification, par exemple du domaine 1 de l'annexine V peut consister à remplacer Glu 72 par Lys ou Orn, et/ou Thr 33 par Lys ou Orn.

30 Selon l'invention, la structure chimique ou l'assemblage de la présente invention peut être utilisée pour préparer un médicament.

Par exemple, le médicament peut être choisi parmi un médicament destiné au traitement d'une thrombose, un médicament destiné au traitement d'une tumeur, un médicament ayant une action anti-inflammatoire.

5        Selon l'invention, la structure ou l'assemblage chimique selon l'invention peut être couplé à une molécule de marquage pour former un composé de marquage.

10       Selon l'invention, la molécule de marquage peut être choisie par exemple parmi une molécule fluorescente, le complexe avidine-biotine, un radioélément, et un composé paramagnétique.

15       La présente invention fournit aussi une trousse de diagnostic comprenant une structure ou un assemblage précité.

Cette trousse de diagnostic peut par exemple comprendre en outre un réactif adéquat permettant de détecter ladite molécule de marquage.

20       La présente invention fournit également une trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure ou un assemblage chimique de la présente invention.

25       La présente invention fournit également une trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure ou un assemblage chimique de la présente invention couplé à un marqueur.

30       D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront encore à la lecture des exemples illustratifs et non limitatifs qui suivent, en référence aux figures en annexe.

**Brève description des figures**

- la figure 1A est une représentation schématique de la structure générale des annexines ;
- 5 - la figure 1B est une représentation schématique de la structure d'un domaine d'une annexine comportant un site calcium ;
- la figure 2 est un schéma illustrant l'insertion dans un vecteur PGEX-2T du cDNA codant pour la structure chimique de la présente invention pour produire ledit composé par génie génétique ;
- 10 - la figure 3 est une représentation schématique d'un spectre RMN  $^1\text{H}$  du domaine 1 de la présente invention de l'annexine I présentant la région des aliphatiques ;
- 15 - la figure 4 est une représentation graphique de la dénaturation du domaine 1 de la présente invention de l'annexine I par le chlorure de guanidinium ;
- 20 - la figure 5 est une représentation graphique de la dénaturation thermique du domaine 1 de la présente invention de l'annexine I ;
- la figure 6a représente la séquence de l'annexine I, notée séquence ID n°1, dans laquelle la séquence du domaine 2 de la présente invention a été soulignée ;
- 25 - la figure 6b représente la séquence de l'annexine V, notée séquence ID n°2, dans laquelle la séquence du domaine 1 de la présente invention a été soulignée ;
- 30 - la figure 6c représente la séquence de l'annexine III, notée séquence ID n°3, dans

laquelle la séquence du domaine 2 de la présente invention a été soulignée ;

- 5       - la figure 6d représente la séquence de l'annexine IV, notée séquence ID n°4 et séquence ID n°5, dans laquelle la séquence des domaines 1 et 2 de la présente invention ont été soulignées ;
- 10       - la figure 7 est une représentation schématique de la structure de construction (I) de la présente invention liée à une molécule de phosphatidylsérine mettant en évidence les interactions entre les fonctions de liaison L1 à L6 de la structure de construction (I) de l'invention et une molécule de phosphatidylsérine ;
- 15       - la figure 8 est une représentation schématique des interactions entre les résidus ligands du domaine 1 de la présente invention de l'annexine V humaine représenté sur la figure 6b, et une molécule de phosphatidylsérine en présence d'un atome de calcium ;
- 20       - les figures 9A et 9B sont des photographies de gels de polyacrylamide qui illustrent la fixation de l'annexine V et de certains de ses mutants sur des membranes constituées de phosphatidylcholine et de phosphatidylsérine (surnageant S2).
- 25



## EXEMPLES

**Exemple 1 : Expression et purification des peptides de séquences ID n°1 et ID n°2 de la présente invention**

5 Les séquences ID n°1 et ID n°2 des annexines I et V ont été préparées par surexpression dans *E. Coli* selon le même protocole que celui qui a été décrit par F. Cordier-Ochsenbein et al. dans J. Mol. Biol. 279, 1177-1185.

10 Le cDNA de ces séquences d'annexines a été préparé en utilisant la PCR à partir du cDNA des annexines correspondantes. Le cDNA a été inséré dans le vecteur pGEX-2T (Smith & Jonhson, 1998). La figure 2 est un schéma illustrant l'insertion du cDNA dans le vecteur.

15 L'absence de mutations induites par la PCR a été contrôlée par séquençage. La production du peptide est effectuée en utilisant la souche *E. Coli* BL21 contenant le vecteur d'expression décrit plus haut. Après induction par l'isopropylthiogalactopyranoside (IPTG,

20 100 µm) jusqu'à une densité optique de 1 à 600 nm, la pousse est continuée jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint, c'est-à-dire pendant environ 3 heures. Après centrifugation, les bactéries sont resuspendues dans le tampon de lyse comprenant 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM

25 EDTA, 500 mM NaCl, 5% (v/v) glycérol, 1% (v/v) Triton X100, 1 mM dithiothréitol (DTT), 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) et 20 µg/ml aprotinine.

La purification a été effectuée de la façon

30 suivante : après sonification et centrifugation à 10000 g, le surnageant contenant les protéines solubles est incubé avec des billes de glutathion/agarose permettant la liaison spécifique à ces billes de la



protéine de fusion GST-domaine. Après lavage avec une solution contenant 1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl à pH 8, 70 unités de thrombine par litre de culture sont ajoutés et la séquence est éluée.

5 La séquence est alors purifiée sur une colonne proRPC (marque de commerce) de type 16/10, fournie par la société Pharmacia en utilisant un système FPLC et un gradient linéaire d'eau de qualité Millipore (marque de commerce) contenant 0,1% (v/v) d'acide trifluoroacétique TFA, et d'acétonitrile contenant 0,1% de TFA. La vitesse d'écoulement est ajustée à 2,5 ml/minute. La séquence est ensuite lyophilisée. Le rendement final est d'environ 8 mg de séquence par litre de culture.

15

**Exemple 2 : Stabilité de la séquence ID n°1 de l'annexine 1**

Différentes expériences montrent que cette séquence constitue une protéine de repliement stable.

20 La figure 3 montre un spectre 1D de RMN  $^1\text{H}$  du proton de la séquence ID n°1 isolée de l'annexine 1, en solution aqueuse. La dispersion des fréquences de résonance et la présence de résonances à des déplacements chimiques inférieurs à 0 ppm indiquent  
25 clairement que cette séquence est fortement structurée. De plus, les données de déplacement chimique des protons  $\alpha$  révèlent la présence de 5 hélices conformément à la structure cristallographique.

La figure 4 montre la dénaturation coopérative du  
30 domaine 1 de l'annexine I issu de la séquence ID n°1 par le chlorure de guanidinium, qui est un dénaturant classique et la figure 5 montre la dénaturation coopérative de la séquence par la température.

Des données analogues sont obtenues pour les autres séquences décrites précédemment et démontrent que certaines séquences d'annexine se comportent comme de petites protéines de stabilité normale, utilisables  
5 directement, ou comme plate-forme, pour l'ingénierie de composés fonctionnels nouveaux.

**Exemple 3-1 : Rôle essentiel du domaine 1 de l'annexine V issu de la séquence ID n°2 dans la liaison de**  
10 **l'annexine V aux membranes**

Des expériences de liaison de l'annexine V à des systèmes membranaires modèles ainsi que des expériences d'inhibition de la protéine kinase c (PKC) *in vitro*, et de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) cytoplasmique (cPLA<sub>2</sub>) *in*  
15 *vivo* démontrent le rôle essentiel joué par le domaine 1 dans cette liaison aux membranes.

On prend ici comme exemple le cas de l'inhibition de la cPLA<sub>2</sub>. L'inhibition de l'activité phospholipasique par l'annexine V résulte de la  
20 déplétion du substrat lipidique commun à ces deux protéines. Divers mutants de l'annexine V ont été construits pour éliminer de façon sélective dans un ou plusieurs domaines la capacité de lier le calcium, c'est-à-dire les phospholipides. La mutation consiste à  
25 remplacer le ligand bidentate du calcium, Glu ou Asp, d'une séquence de la présente invention par un résidu non liant, Gln ou Asn respectivement. Douze mutants ont ainsi été construits et purifiés : M1, M2, M3, M4, M1M2, M1M3, M1M4, M2M3, M1M2M3, M1M2,M4, M2M3M4 et  
30 M1M2M3M4, le chiffre indiquant le domaine pour lequel la capacité de lier le calcium a été supprimée. L'ensemble des résultats montre que l'activité phospholipasique de la PLA<sub>2</sub> cellulaire, mesurée par le

taux de relargage d'acide arachidonique, dépend fortement de la présence du site calcium dans le domaine 1 et à un moindre degré dans le domaine 4. La suppression des sites calcium dans les domaines 2 et 3 n'a quasiment aucun effet sur l'inhibition de l'activité phospholipasique de la cPLA<sub>2</sub>. (Mira et al. J. Biol. Chem. 1997, 272:10474-10482 ; Dubois et al. Biochem. J. 1998, 330:1277-1282).

Le tableau (I) suivant regroupe certains résultats de cet exemple, et montre le pourcentage de diminution de la liaison des mutants de l'annexine V aux phospholipides par rapport à l'annexine V sauvage.

Annexine V sauvage	M1	M2	M3	M4	M1M2M3	M1M2M4
0	79 $\pm$ 6	38 $\pm$ 4	47 $\pm$ 9	38 $\pm$ 6	98 $\pm$ 1	85 $\pm$ 7

Ce tableau (I) montre la liaison aux membranes de l'annexine V et de ses mutants M1, M2, M3, M4, M1M2M3 et M1M2M4. Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution de la capacité de liaison par rapport à l'annexine V sauvage (valeur moyenne  $\pm$  erreur standard). Pour les mutants M123 et M124, le taux de liaison résiduel n'est pas significatif.

**Exemple 3-2 : Résultats préliminaires concernant la liaison de l'annexine V et de divers mutants aux membranes modèles composées de phosphatidylcholine et de phosphatidylsérine**

Les mutants suivants de l'annexine V humaine ont été préparés selon les méthodes décrites dans l'exemple 1 :

M1M2M3M4 : le site calcium principal, correspondant à la boucle AB, est supprimé dans tous les domaines par une mutation du ligand bidentate.

5 M2M3M4 : le site calcium principal des domaines 2,3 et 4 est supprimé par une mutation du ligand bidentate, celui du domaine 1 subsiste.

10 M2M3M4-Arg22Ala-Arg63Ser : suppression des ligands L2 et L3 du site PS de la présente invention.

M2M3M4-Arg22Ala-Arg63Ser-Lys29Ala-  
Asp68Ile/Phe/Trp : suppression de tous les ligands du site PS de la présente invention sauf ceux concernant le site calcium qui eux  
15 sont conservés.

La liaison aux membranes PC/PS des mutants de l'annexine V est alors comparée à celle de la forme sauvage selon le protocole suivant :

Un mélange homogène de PC/PS dans une proportion  
20 80/20 est mis en suspension dans des solutions contenant des concentrations variables de calcium à 0, 30, 100, 1000  $\mu$ M. Les diverses protéines sont ensuite introduites et incubées pendant quelques minutes. La suspension est ensuite centrifugée par  
25 ultracentrifugation à 90000 t/mn. Les membranes sédimentent au fond du tube. Le surnageant, appelé S1, est entièrement prélevé pour analyse ultérieure du contenu en protéine qui donnera l'information sur la quantité de protéine non liée à la membrane. Le culot  
30 de membrane est ensuite dispersé dans une solution contenant de l'EDTA en quantité suffisante pour le relargage des protéines, la liaison de l'annexine V étant réversible et dépendante du calcium. La

suspension est de nouveau centrifugée et un second surnageant, appelé S2, est récupéré. L'analyse du contenu en protéine de S2 fournira l'information concernant la quantité des protéines qui étaient fixées à la membrane.

L'analyse des surnageants est effectuée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide d'une façon classique qu'il est inutile de décrire ici.

Les figures 9A et 9B en annexe montrent l'ensemble des résultats.

Sur cette figure :

Sauvage : A5 = annexine V

Mutants :

D68F=M2M3M4-Arg22Ala-Arg63Ser-Lys29Ala-Asp68Phe

D68I=M2M3M4-Arg22Ala-Arg63Ser-Lys29Ala-Asp68Ile

D68W)M2M3M4-Arg22Ala-Arg63Ser-Lys29ala-Asp68Trp

1,2,3,4=concentration en calcium respectivement 0,30, 100, 1000  $\mu$ M

T=témoins de masse moléculaire

Le comportement des mutants M1M2M3M4 et M2M3M4, comparé à celui de l'annexine V sauvage montre clairement que la liaison aux membranes en présence de calcium est quasi uniquement assurée par le domaine 1, c'est-à-dire qui contient le site PS revendiqué. Ce résultat confirme ceux présentés dans l'exemple 3-1 précédent.

Le comportement des mutants M2M3M4-Arg22Ala-Arg63Ser et M2M3M4-Arg22Ala-Arg63Ser-Lys29Ala-Asp68Ile/Phe/Trp montre que la liaison aux membranes est considérablement atténuée lorsque les ligands L2, L3, L4 et L5 sont supprimés. La liaison n'est cependant pas totalement supprimée dans la mesure où les ligands Lca5, Ca qui font partie du site calcium subsistent et

permettent encore une liaison de la PS mais avec une affinité très diminuée.

**Exemple 4 : Utilisation de la structure chimique de la présente invention**

Trois voies d'utilisation sont prévues : i) simple ingénierie des domaines pour satisfaire aux diverses exigences liées à leur utilisation comme outils de recherche, de diagnostic et de thérapeutique ; ii) "re-design" de la plate-forme qui constitue la topologie du domaine en une nouvelle plate-forme plus simple et synthétisable par voie chimique ou par génie génétique ; iii) remplacement de la plate-forme peptidique ou peptoïdique par une structure organique non-peptidique pour la fabrication d'un médicament. Dans les trois cas, il s'agit naturellement de conserver, voire d'améliorer, la localisation spatiale des fonctions de liaison avec les phospholipides, décrits plus haut.

**1) Ingénierie des domaines d'annexines**

Les domaines d'annexines de la présente invention constituent des plates-formes peptidiques. On entend par ingénierie la modification de la séquence des domaines par mutagénèse afin d'améliorer la stabilité générale de la molécule et de l'adapter aux conditions physico-chimiques imposées par l'utilisation, d'améliorer son affinité pour le ligand phospholipidique, et lui conférer une spécificité propre à chaque phospholipide. Il s'agit aussi de permettre l'introduction de différents marqueurs pour les différentes applications dont il est question plus

loin. Nos connaissances actuelles sont largement suffisantes pour effectuer une telle ingénierie.

Les exemples d'un changement de propriété ont été illustrés dans l'exemple 4 Ils ont été obtenus par une technique classique de génie génétique en mutant les acides aminés impliquées.

## 2) "Re-design" des plates-formes peptidiques

Le "re-design" de la plate-forme consiste à redéfinir une architecture moléculaire, tout en gardant la topologie convenable des résidus impliqués dans la liaison au calcium et aux phospholipides. L'intérêt du "re-design" est de créer une plate-forme de séquence plus courte pouvant être produite par synthèse chimique. La synthèse d'un peptide de la taille d'un domaine est possible mais reste difficile. La réduction par deux du nombre de résidus, soit environ 35 résidus, rend par contre la synthèse couramment réalisable. Dans cette opération de "re-design", on conserve assez précisément la géométrie permettant des interactions avec le phospholipide, et notamment la disposition des résidus de la séquence annexine. Ces résidus sont ceux indiqués en gras sur les figures 6a à 6d pour les annexines (I) à (V).

Cet ensemble comprend deux résidus basiques, généralement Arg-x-x-x-Lys, à la fin de l'hélice A du domaine concerné et une série de résidus acides, basiques et neutres, généralement Arg-x-x-x-x-Asp-x-x-Ser-Asp, situés dans l'hélice D. L'étude de la structure moléculaire montre, figures 7 et 8, que ces résidus sont parfaitement disposés pour lier une molécule de phosphatidylsérine. Le groupe carboxylate de ce lipide est lui-même lié à l'atome de



calcium situé dans la boucle AB et désigné dans la suite par "site calcium AB".

La séquence :

5 **Arg-x-x-x-Lys** (hélice A) ---- **Arg-x-x-x-x-Asp-x-x-Ser-Asp** (hélice D)

associée à celle du site calcium AB, constitue donc une séquence consensus pour la liaison de la phosphatidylsérine dans les composés de la présente invention. Pour généraliser, on désignera maintenant cette séquence par :

**RL1-x-x-x-RL2-----RL3-x-x-x-x-RL4-x-x-RL5-RL6**

15 où RL1 à RL6 sont les résidus ligands essentiels dans la liaison de la phosphatidylsérine indiqués en gras dans les séquences des figures 6a à 6d et indiqué dans les composés de structure (I) à (VI). La séquence consensus du site calcium AB est la suite :

20

**Met-Lys-Gly-x-Gly-Thr-----Asp** (ou **Glu**)

Les ligands du calcium sont les groupes carboxyl peptidiques des résidus en italique (résidus de la boucle AB) sur la figure et les deux atomes d'oxygène du groupe carboxylate de la chaîne latérale du résidu Asp (ou Glu) de la fin de l'hélice D, dénommé aussi ligand bidentate. En généralisant ces ligands du calcium seront maintenant désignés par :

30

**RCa1-RL2-RCa2-x-RCa3-Thr----- (RCa4RCa5) ou RL6**



Dans le cas de l'annexine, RCa4 et RCa5 constituent un seul et même résidu déjà identifié précédemment comme RL6.

Les données de distances interatomiques entre les  
5 résidus ligands sont donnés dans le tableau (II)  
suivant en référence à la figure 7 en annexe et les  
interactions précises domaine-calcium-  
phosphatidylsérine sont indiquées dans le tableau (III)  
suivant en référence à la figure 8 en annexe.

10 Sur la figure 8, Ch1 et Ch2 représentent la  
position d'éventuelles chaînes carbonnées du  
phospholipide. Ces chaînes peuvent être celles  
décrites, par exemple l'acide arachidonique.

Selon l'invention, la structure chimique peut être  
15 constituée de la façon suivante :

a) elle comporte en particulier au moins 6  
résidus, dits résidus ligands, nommés RL1 à RL6 et dont  
la nature est la suivante :

20 RL1 = Arg ou Lys ou Orn  
RL2 = Arg ou Lys ou Orn  
RL3 = Arg ou Lys ou Orn  
RL4 = Asp ou Glu  
RL5 = Ser ou Thr ou Asp ou Glu  
RL6 = Arg ou Lys ou Orn

25 b) les carbones  $\alpha$  des résidus ligands RL1 à RL6  
sont disposés dans l'espace de manière à ce que les  
chaînes latérales soient directement accessibles aux  
phospholipides,

c) les carbones  $\alpha$  des résidus ligands RL1 à RL6  
30 sont disposés selon le tableau II de distances  
suivant :

Carbone $\alpha$	RL2	RL3	RL4	RL5	RL6
RL1	0,45 à 0,65	0,7 à 1,2	0,7 à 1,0	0,85 à 1,15	0,65 à 0,95
RL2		0,5 à 1,05	0,8 à 1,2	1,2 à 1,7	0,9 à 1,4
RL3			0,5 à 0,8	1,0 à 1,3	1,2 à 1,7
RL4				0,45 à 0,75	0,7 à 1,2
RL5					0,4 à 1,2

d) les chaînes latérales des résidus ligands RL1 à LR6 permettent d'établir un réseau de liaisons hydrogène avec la phosphatidylsérine selon le schéma où les flèches -----> désignent au moins une liaison hydrogène, figure 8, dans le sens donneur vers accepteur et L1 à L6 désignent les ligands de la phosphatidylsérine selon la liste suivante :

- 10 L1 = NZLYs ou CZArg de LR1  
 L2 = NZLys ou CZArg de LR2  
 L3 = NZLys ou CZArg de LR3  
 L4 = CGAsp ou CDGlu de LR4  
 L5 = CB de Ser ou Thr ou CG de Asp ou CD de Glu de LR5  
 15 L6 = NZLys ou CZArg de LR6

- HN = H  
 NZ = N zeta  
 CZ = C zeta  
 20 OD = O delta  
 OG = O gamma  
 OE = O epsilon

où les distances entre les ligands L1 à L6 et les atomes de la phosphatidylsérine sont données dans le tableau III suivant :

5 Distances nm x 10

	N	C $\beta$	C $\gamma$	O1	O2	O3	O4	Cl chaîne Ch1	Cl chaîne Ch2
L1	0,35 à 0,65	0,3 à 0,5	0,25 à 0,45	0,2 à 0,35	0,25 à 0,5	0,35 à 0,6	0,2 à 0,35	0,4 à 0,7	0,5 à 0,8
L2	0,55 à 0,85	0,45 à 0,75	0,45 à 0,75	0,4 à 0,6	0,2 à 0,4	0,4 à 0,6	0,25 à 0,45	0,7 à 1,1	0,7 à 1,1
L3	0,4 à 0,6	0,4 à 0,6	0,45 à 0,75	0,4 à 0,6	0,2 à 0,4	0,2 à 0,35	0,25 à 0,5	0,7 à 1,1	0,6 à 1,0
L4	0,25 à 0,45	0,3 à 0,5	0,35 à 0,55	0,55 à 0,85	0,5 à 0,75	0,4 à 0,65	0,4 à 0,6	0,8 à 1,2	0,8 à 1,2
L5	0,25 à 0,5	0,45 à 0,65	0,5 à 0,75	0,65 à 0,95	0,65 à 0,95	0,5 à 0,8	0,5 à 0,9	0,8 à 1,2	0,6 à 1,0
L6	0,3 à 0,5	0,35 à 0,55	0,3 à 0,45	0,65 à 0,95	0,7 à 1,0	0,65 à 0,95	0,5 à 0,8	0,6 à 1,0	0,8 à 1,2

Pour le ligand L1, deux au moins des cinq distances indiquées dans ce tableau sont de préférence respectées.

### 3) Plate-forme organique

La troisième étape constitue l'étape ultime pour l'obtention d'un médicament facilement utilisable par voie orale. Il s'agit du remplacement de la plate-forme peptidique par une structure organique respectant la disposition spatiale des ligands phospholipidiques. Les ligands calciques et phospholipidiques ne sont plus des

résidus aminoacides mais des fonctions chimiques reproduisant les interactions décrites plus haut.

Les structures organiques couramment utilisées en pharmacologie peuvent permettre de construire des  
5 plates-formes rigides capables de présenter un site de liaison pour le phospholipide selon l'invention. Ces structures peuvent être constituées par les techniques chimiques classiques connues de l'homme du métier, qu'il n'est pas nécessaire ici de rappeler.

10

**Exemple 5 :**

De manière très avantageuse, l'utilisation d'une structure ou d'un assemblage de la présente invention peut se faire comme indiqué précédemment dans trois  
15 directions : recherche, diagnostic et thérapeutique.

1) la recherche

Pour ces expériences, il convient de coupler une structure de la présente invention à une molécule de  
20 marquage permettant une détection. Ces molécules de marquage peuvent être celles précitées par exemple des molécules fluorescentes, un système avidine-biotine, des radioéléments, et de manière générale, celles couramment utilisées.

25

2) le diagnostic

Les structures chimiques et assemblages de la présente invention peuvent comme indiqué précédemment être utilisés pour la détection "in vitro" de  
30 pathologies impliquant l'apparition de charges négatives à la surface des cellules et la libération dans le sang de microvésicules : par exemple les

troubles de la coagulation, les pathologies inflammatoires aiguës, etc...

Ils peuvent aussi être couplés à des radioéléments à vie courte et détection "in vivo" de la localisation  
5 des zones thrombotiques lors d'accidents vasculaires de toute sorte, en particulier cérébraux, utilisant des systèmes d'imagerie.

Ils peuvent aussi être couplés à des composés paramagnétiques, par exemple un complexe de gadolinium,  
10 et détection "in vivo" de la localisation des zones thrombotiques lors d'accidents vasculaires de toute sorte, en particulier cérébraux, utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Les couplages précités peuvent être réalisés par  
15 les techniques classiques de chimie organique connues de l'homme du métier, qu'il n'est pas utile ici de rappler.

### 3) le médicament

20 Les structures et assemblages de la présente invention peuvent être utilisés en tant que tels pour fabriquer un médicament utilisable pour un traitement ou pour une prophylaxie car ils possèdent des propriétés anticoagulante, antithrombolytique et anti-  
25 inflammatoire intrinsèques.

Les assemblages selon l'invention permettent d'effectuer un tapissage des surfaces cellulaires, capable d'interdire l'accès de composés impliqués dans les étapes primaires de la coagulation sanguine et les  
30 phénomènes inflammatoires à ces surfaces.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent également être utilisés pour le

ciblage de molécules à un site du thrombus, de l'inflammation, ou vers une zone tumorale.

Dans cette utilisation, les structures et assemblages de la présente invention sont couplés à une  
5 molécule qui a une action thrombolytique, à une molécule qui a une action anti-inflammatoire, ou à une molécule qui a une action anti-tumorale respectivement.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent donc être utilisés par exemple pour  
10 fabriquer un médicament utilisable dans le traitement et la prophylaxie de la thrombose. Le couplage des structures et assemblages à des molécules à action thrombolytique permet un ciblage de ces dernières vers les zones thrombogènes. Les molécules thrombolytiques  
15 telles que les streptokinases, les urokinases, et les activateurs du plasminogène peuvent être utilisées.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent aussi être utilisés couplés à une molécule ayant une action anti-inflammatoire pour  
20 fabriquer un médicament utilisable par exemple par voie locale ou par voie orale dans des pathologies aiguës comme l'asthme, la RCH, le Crohn, le choc septique, les maladies du collagène et l'arthrite.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent aussi être utilisés couplés à une  
25 molécule ayant une action antitumorale. Ce couplage permet de cibler ces dernières molécules vers des zones présentant des charges négatives telles que des tumeurs possédant des foyers cellules apoptotiques, des tumeurs  
30 inflammatoires, etc...

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent également être utilisés pour fabriquer un matériau de recouvrement de biomatériaux

susceptibles d'être thrombogènes. Un biomatériau thrombogène ainsi recouvert perd ses propriétés thrombogènes. Le biomatériau thrombogène peut être par exemple une valve cardiaque.

5 L'invention propose d'utiliser une structure chimique dérivée des protéines de la famille des annexines et leurs domaines isolés, modifiés ou non, capables de se lier réversiblement aux effecteurs lipidiques tel que les phosphatidylsérines, les acides  
10 phosphatidiques, les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylinositophosphates. Il s'agit de fournir un ensemble de composés protéiques, peptidiques, peptoïdes et organiques dont la propriété principale est de reconnaître spécifiquement l'apparition des signaux  
15 lipidiques à la surface des membranes cellulaires en relation avec le fonctionnement normal ou pathologique des tissus. Les pathologies spécialement visées par l'invention sont : (i) les troubles de la coagulation sanguine, (ii) les phénomènes d'apoptose consécutifs à  
20 l'action de composés chimiques, d'effets physiques comme les radiations ionisantes, d'effets biologiques comme ceux liés à la formation ou la nécrose des tissus cancéreux, outre les phénomènes normaux d'apoptose, (iii) les pathologies inflammatoires aiguës et (iv) les  
25 troubles associés aux relations entre les cellules et la matrice extra-cellulaire et notamment le collagène.

Outre l'ingénierie complète des annexines entières, un des aspects de l'invention est l'utilisation de domaines et de modules covalents  
30 d'annexines soit directement soit comme plate-forme pour l'ingénierie de composés peptidiques fonctionnels. Il s'agit donc d'utiliser ces domaines et modules soit sous leur forme naturelle, soit modifiés par les voies

de la mutagénèse ou de la chimie, pour en faire des composés répondant aux critères biologiques exposés dans le paragraphe précédent.

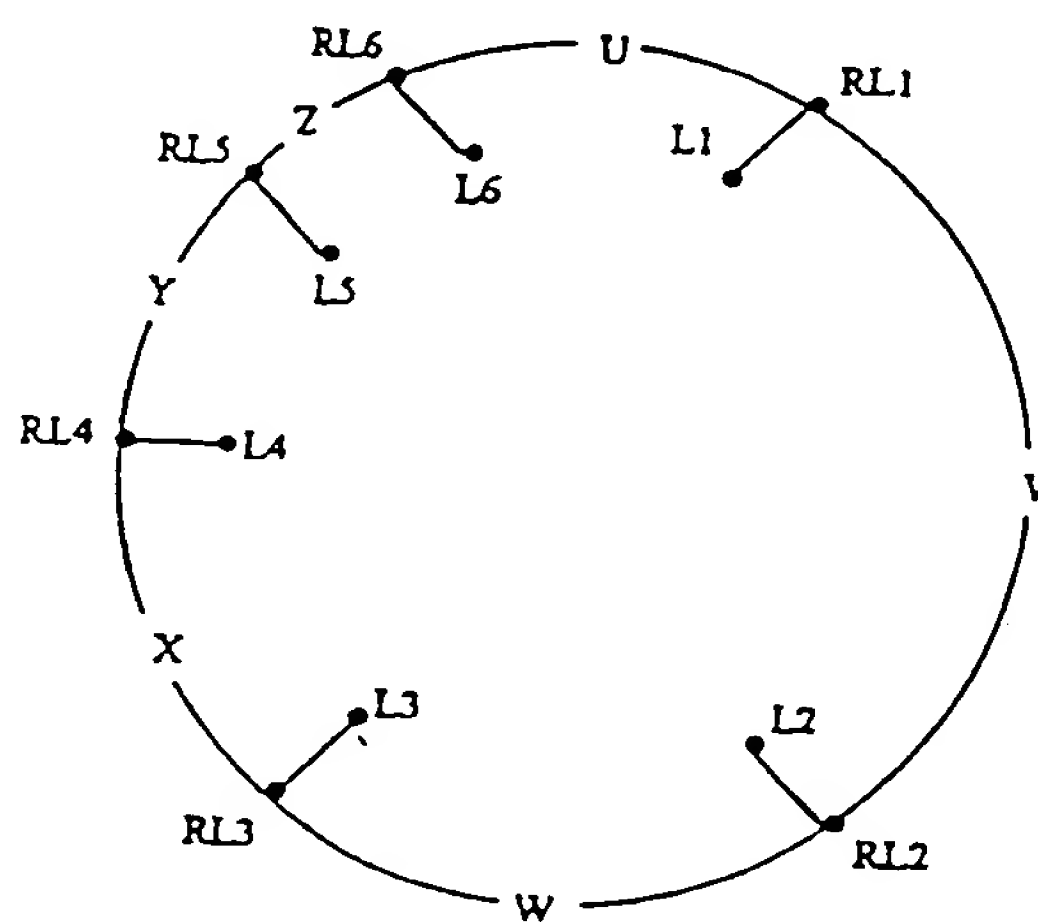
De par leur faible taille, ces domaines peuvent  
5 être facilement associés à d'autres protéines soit pour former des protéines chimères multifonctionnelles, soit pour introduire un mécanisme de régulation par des effecteurs autres que les phospholipides de signalisation. De plus, l'invention se propose de  
10 redéfinir, par les méthodes de l'ingénierie des protéines, la spécificité des domaines pour les différents lipides de signalisation évoqués plus haut.

L'invention propose enfin de reconstruire ces domaines, par de novo design, pour en faire des  
15 composés de taille plus restreinte et accessible à la synthèse peptidique et en particulier à l'introduction de résidus aminoacides non naturels dans le but d'augmenter la durée de vie de ces composés dans l'organisme.



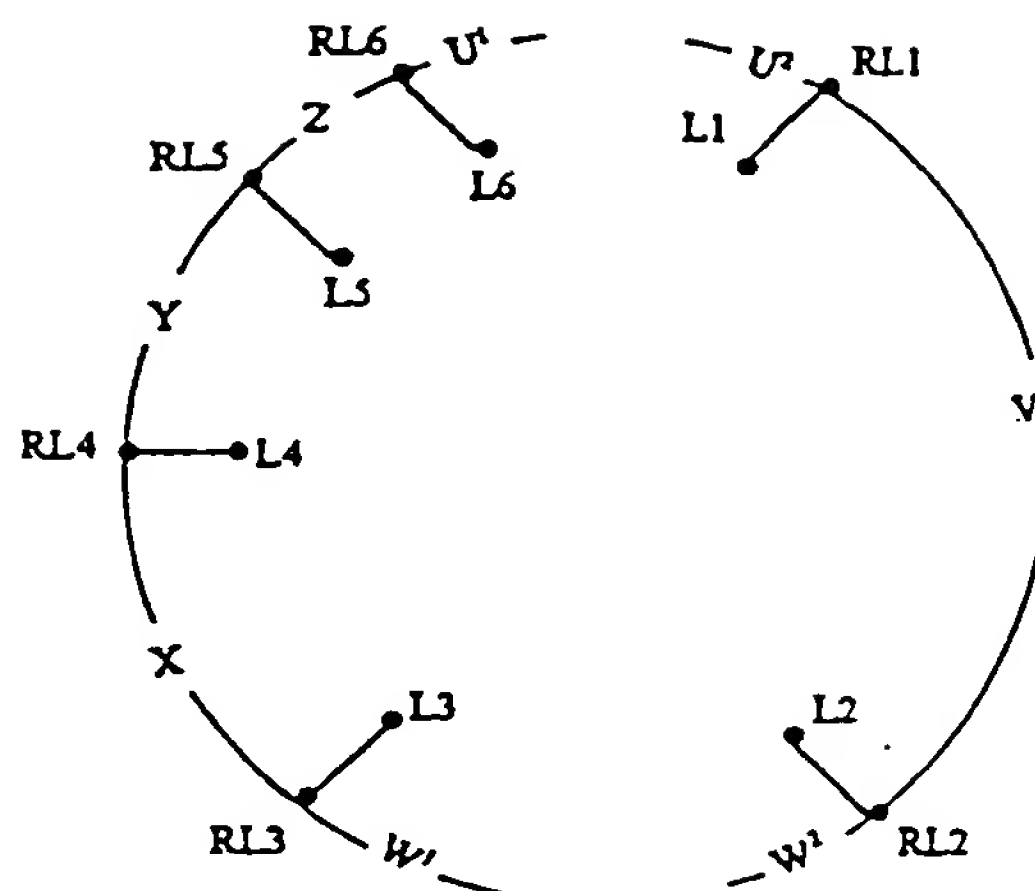
## REVENDICATIONS

1. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une plate-forme chimique U, V, W, X, Y comportant six résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6 supportant un ensemble de fonctions chimiques pouvant se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, ces fonctions chimiques L définissant au moins en partie l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (I), (II) et (III) suivantes :

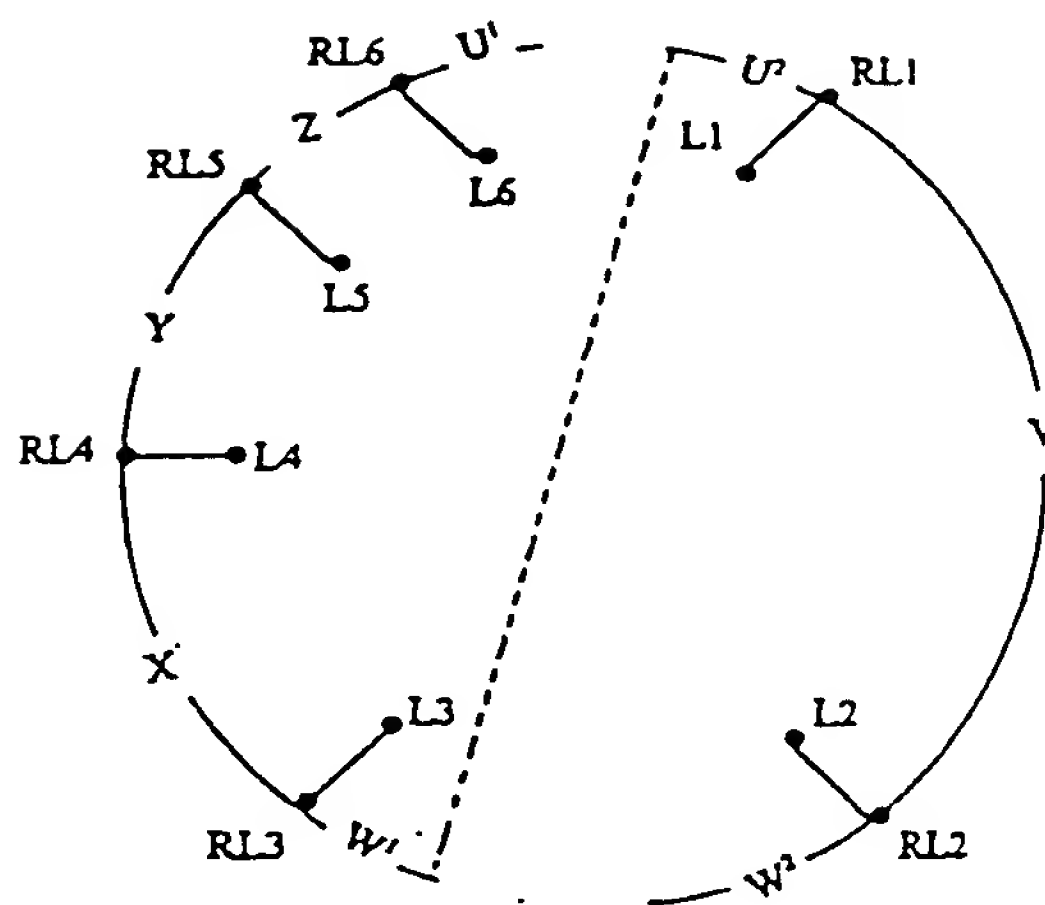


(I)

42



(II)



(III)

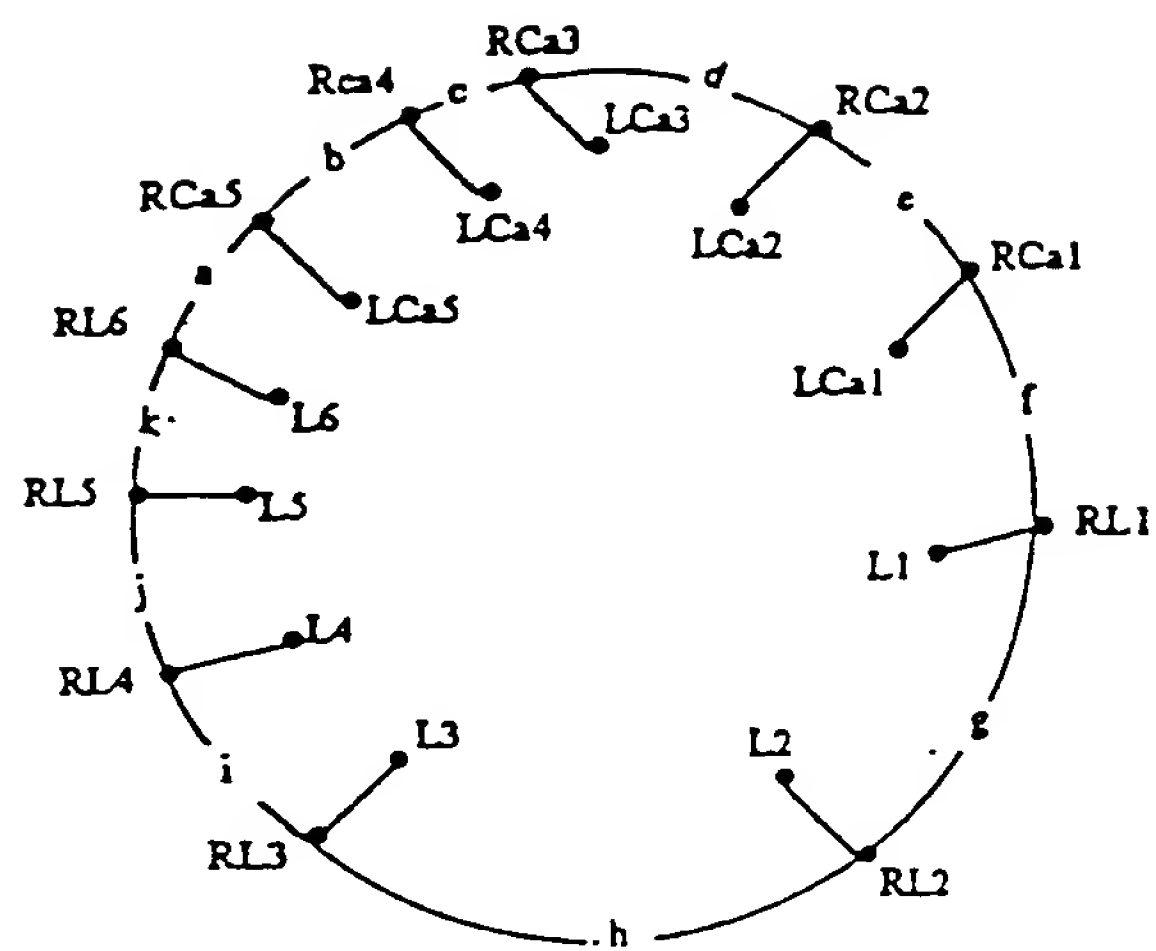
5

dans lesquelles  $U$ ,  $U^1$ ,  $U^2$ ,  $V$ ,  $W$ ,  $W^1$ ,  $W^2$ ,  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$  sont  
indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel,  
un peptide constitué d'acides aminés naturels ou non  
naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s)  
10 cyclique(s) carboné(s),

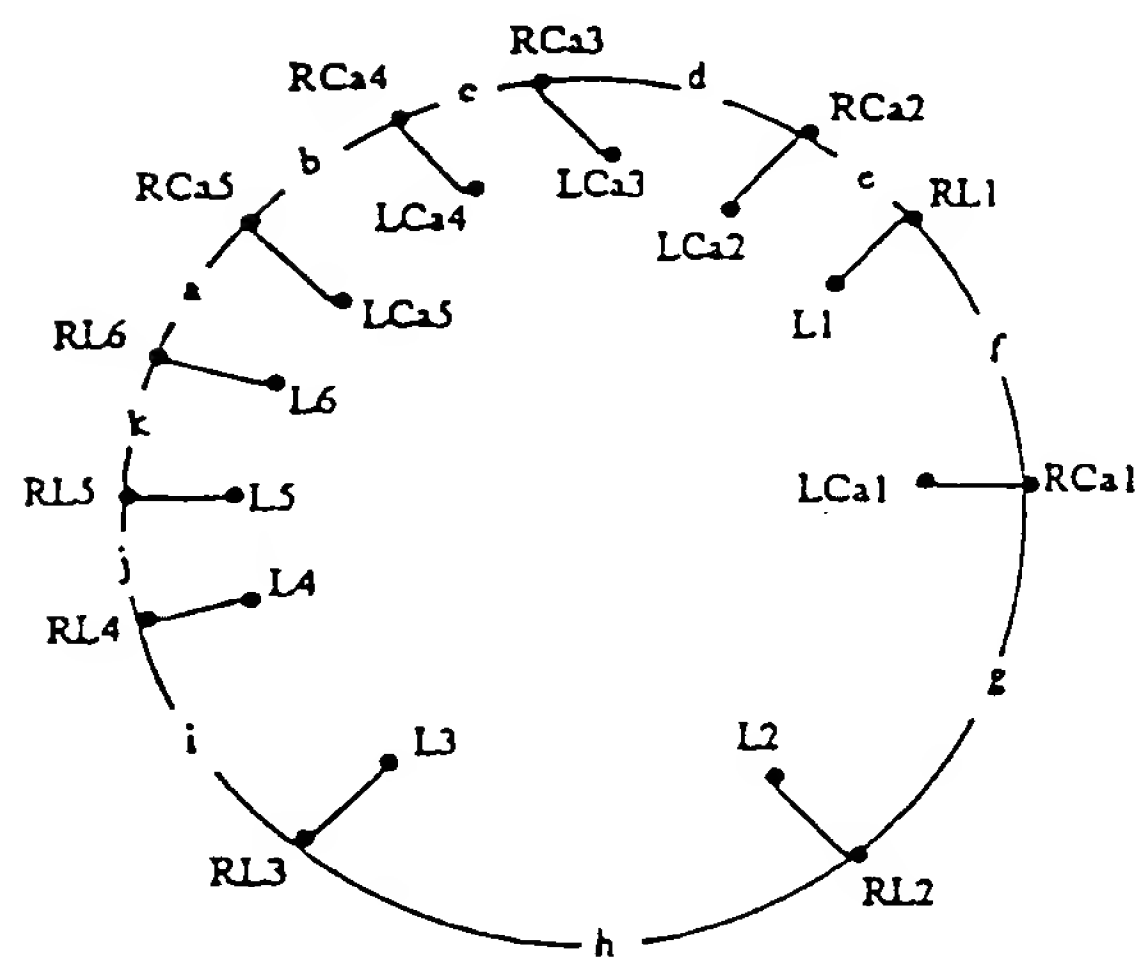
dans lesquelles RL1 à RL6 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement, lesdites fonctions chimiques comprenant soit au moins une charge positive et  
5 donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, et dans lesquelles U, U<sup>1</sup>, U<sup>2</sup>, V, W, X, Y et Z sont tels que RL6 et RL1 sont distants de 0,65 à 0,95 nm, L6 et L1 sont distants de 0,65 à 0,9 nm, RL1 et RL2 sont  
10 distants de 0,45 à 0,65 nm, L1 et L2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et RL5 sont distants de  
15 0,45 à 0,75 nm, L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, et L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm.

2. Structure chimique ayant une affinité pour un  
20 phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une plate-forme chimique a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l comportant 11 résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6, RCa1, RCa2, RCa3, RCa4 et RCa5 supportant un ensemble de fonctions chimiques pouvant  
25 se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, et un ensemble de fonctions chimiques de liaison à un atome de calcium appelées LCa1, LCa2, LCa3, LCa4, LCa5 respectivement, ces  
30 fonctions chimiques RL1 à RCa5 définissant au moins en partie l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (IV), (V) et (VI) suivantes :

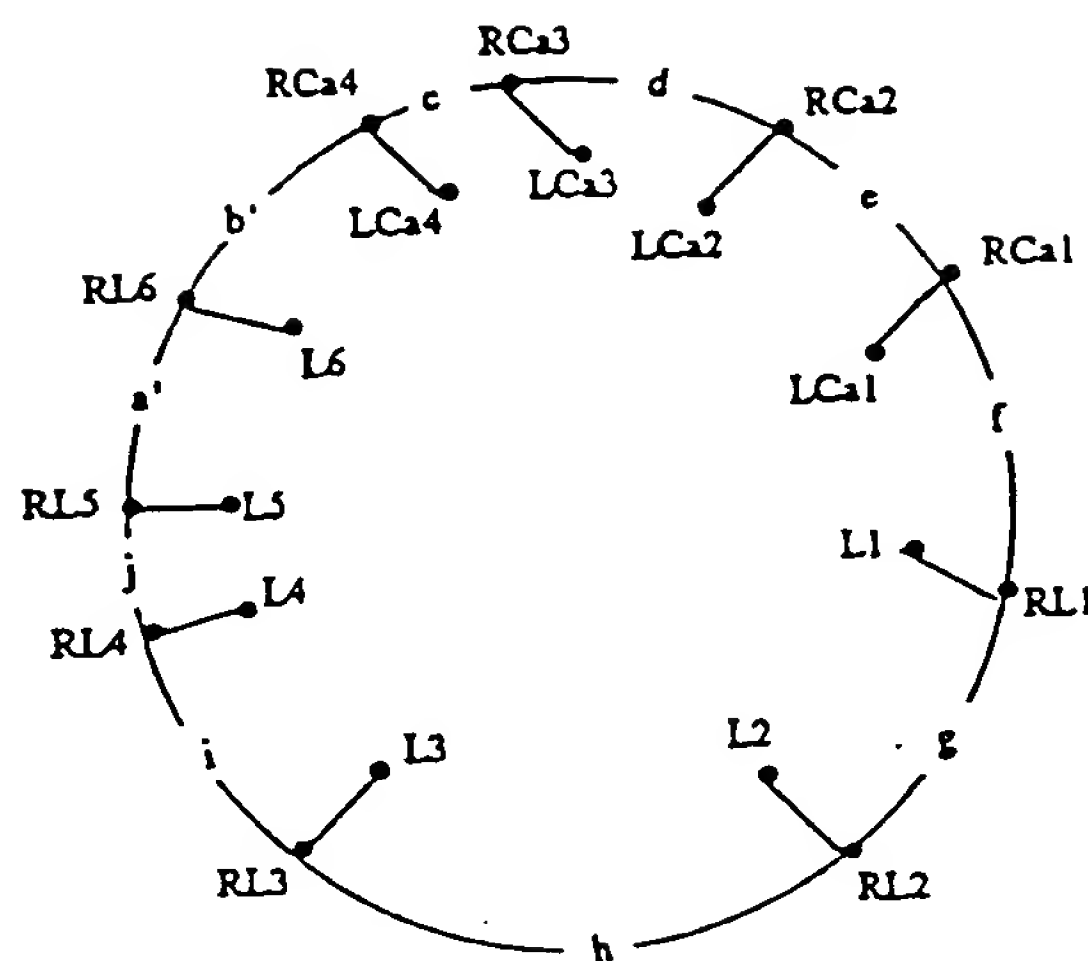
44



(IV)



(V)



(VI)

dans lesquelles a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l sont indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel, un peptide constitué d'acides aminés naturels ou non naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s) cyclique(s) carboné(s),

dans lesquelles RL1 à RL6 et RCa1 à RCa5 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 et LCa1 à LCa5 respectivement, lesdites fonctions chimiques L1 à L6 comprenant soit au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, lesdites fonctions chimiques LCa1 à LCa5 comprenant un atome d'oxygène, et dans lesquelles a dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RL6 et RCa5 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa5 sont distants de 0 à 0,3 nm, b dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RCa5 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que LCa5 et LCa4 sont distants de 0,2 à

0,3 nm, b' dans la structure de construction (VI) est tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, c et d sont tels que RCa4 et RCa3 sont distants de 0,5 à 0,9 nm, LCa4 et LCa3 sont distants de 0,2 à 0,4 nm, RCa3 et RCa2 sont distants de 0,35 à 0,6 nm, et LCa3 et LCa2 sont distants de 0,22 à 0,3 nm, e, f, g, dans les structures de construction (IV), (V), (VI) sont tels que RL1 et RL2 sont distants de 0,45 à 0,65 nm, RCa1 à RCa2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, L1 et L2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm et LCa1 et LCa2 sont distants de 0,3 à 0,4 nm, h, i, j et k sont tels que RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et RL5 sont distants de 0,45 à 0,75 nm, L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, et L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, a' dans la structure de construction (VI) est tel que RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm et tel que L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, et b' dans la structure de construction (VI) est tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, la structure pouvant être soit fermée, soit ouverte en a et/ou en h.

3. Structure chimique selon la revendication 1, dans laquelle L1, L2, L3 et L6 présentent chacun au moins une charge positive et donneuse de liaisons hydrogène, et L4 et L5 présentent chacun au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

4. Structure chimique selon la revendication 2, dans laquelle L1, L2, L3 et L6 présentent chacune au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, et L4, L5, LCa5, LCa4, LCa3, LCa2 et LCa1  
5 présentent chacune au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

5. Structure chimique selon la revendication 1, dans laquelle U, V, W, X, Y et Z sont des peptides  
10 constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 sont des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 étant les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides  
15 aminés.

6. Structure chimique selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle RL1, RL2, RL3 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Arg, Lys, Orn,  
20 dans laquelle RL4 est choisi indépendamment parmi Asp ou Glu, et dans laquelle RL5 est choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, les chaînes latérales de ces acides aminés présentant les fonctions chimiques de liaison au  
25 phospholipide L1 à L6 respectivement.

7. Structure chimique selon la revendication 3 ou 4, dans laquelle RL1 à RL6 sont disposés dans l'espace formé par U, V, W, X, Y, Z de manière à ce que les  
30 fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement de leur chaîne latérales soient directement accessibles au phospholipide chargé négativement.

8. Structure chimique selon la revendication 1, comprenant en outre un site calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide.

5

9. Structure chimique selon la revendication 2, dans laquelle a ou a', b ou b', c, d, e, f, g, h, i, j, k sont des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 sont des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 et LCa1 à LCa5 étant les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides aminés, et RCa1 à RCa5 étant des acides aminés naturels ou non naturels.

15

10. Structure chimique selon la revendication 8, dans laquelle RL1 à RL6 et RCa1 à RCa2 sont disposés dans l'espace formé par a, b, c, d, e, f, g, h, i, j et k de manière à ce que les fonctions chimiques de liaisons L1 à L6 respectivement et les charges positives du calcium lorsqu'il est lié aux fonctions de liaison LCa1 à LCa5 soient directement accessibles au phospholipide.

25

11. Structure chimique selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle au moins une partie de la plate-forme est une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine, comprenant au moins un desdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement de liaison au phospholipide.

30



12. Structure chimique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans laquelle la plate-forme est une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine, comprenant lesdits résidus  
5 ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement.

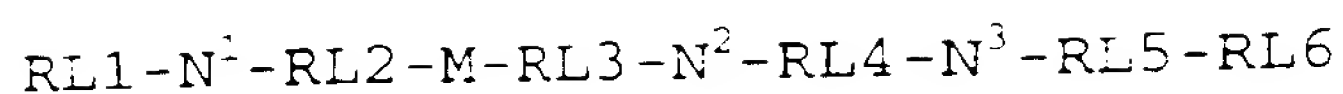
13. Structure chimique selon la revendication 12, dans laquelle le domaine de l'annexine est choisi parmi  
10 le domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, le domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, le domaine 2 de l'annexine III présenté sur la figure 6c et le domaine 1 et 2 de l'annexine IV présentés sur la figure 6d.

15

14. Structure chimique selon la revendication 13, dans laquelle les résidus ligands RL1 à RL6 sont respectivement soit, les résidus Arg25, Lys29, Arg63, Asp68, Ser71 et Glu 72 du domaine 1 de l'annexine V  
20 présenté sur la figure 6b, soit les résidus Arg124, Lys128, Arg162, Asp167, Ser170 et Asp171 du domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, soit les résidus Lys100, Lys104, Lys138, Asp143, Ser146 et Glu147 du domaine 2 de l'annexine III présenté sur la  
25 figure 6c, soit les résidus Arg97, Lys101, Arg135, Asp140, Ser143 et Asp144 du domaine 2 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d, soit les résidus Arg24, Lys28, Arg62, Asp67, Ser70 et Glu71 du domaine 1 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d.

30

15. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend une molécule de formule (VII) suivante :



(VII)

5 dans laquelle  $N^1$  à  $N^3$  représentent chacun indépendamment de 1 à 4 acides aminés choisis indépendamment, naturels ou non naturels, et dans laquelle M est un peptide constitué de 1 à 100 acides aminés naturels ou non naturels ;

10 dans laquelle RL1, RL2, RL3 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn ; RL4 est choisi indépendamment parmi Asp ou Glu ; et RL5 est choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, ladite structure étant linéaire ou cyclique.

15

16. Structure selon la revendication 15, dans laquelle  $N^1$  représente trois acides aminés,  $N^2$  représente quatre acides aminés, et  $N^3$  représente deux acides aminés.

20

17. Structure selon la revendication 15 ou 16, dans laquelle M est un peptide constitué de 33 acides aminés naturels ou non naturels.

25

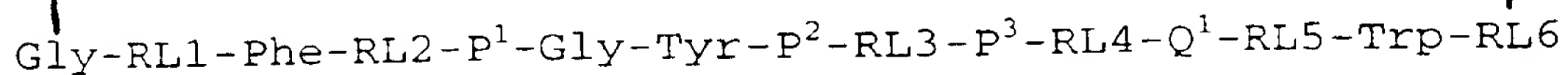
18. Structure selon la revendication 15, dans laquelle la molécule de formule (VII) est une séquence peptidique choisie parmi la séquence peptidique allant de Arg124 à Ser171 dans la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la séquence peptidique allant de Arg25 à Glu72 dans la séquence ID n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence peptidique allant de Lys100 à Glu147 dans la séquence ID n°3 présentée sur la figure 6c, la séquence allant de Arg24 à Glu71 dans la

30

séquence ID n°4 présentée sur la figure 6d, la séquence allant de Arg97 à Asp144 dans la séquence ID n°5 présentée sur la figure 6, ou une séquence modifiée de ces séquences pourvu que RL1, RL2, RL3 et RL6 soient  
5 choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn, RL4 soit choisi indépendamment parmi Asp ou Glu, et RL5 soit choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu.

19. Structure chimique ayant une affinité pour un  
10 phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'une séquence peptidique choisie parmi la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la séquence ID n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence ID n°3 présentée sur la figure 6c et les séquences ID  
15 n°4 et ID n°5 présentées sur la figure 6d, ou une séquence modifiée de celle-ci.

20. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide chargé négativement, caractérisée en ce  
20 qu'elle comprend une séquence peptidique cyclique de formule (VIII) suivante :



25 dans laquelle RL1 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Lys, Orn et Arg ; RL2 et RL3 sont Arg ; RL4 et RL5 sont choisis indépendamment parmi Asp et Glu ; dans laquelle P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> et P<sup>3</sup> sont choisis indépendamment parmi Ser et Thr ; dans laquelle Q<sup>1</sup> est choisi parmi  
30 Gly et Met.

21. Structure chimique selon l'une quelconque des revendications 15 à 19, comprenant en outre un site

calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide chargé négativement.

22. Structure selon l'une quelconque des  
5 revendications précédentes, ladite structure ayant une affinité pour un phospholipide choisi parmi une phosphatidylsérine, une phosphatidyléthanolamine, un phosphatidylinositol, un acide phosphatidique, et un cardiolipide.

10

23. Assemblage chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux structures chimiques définies dans les revendications 1 à 22, identiques ou différentes,  
15 lesdites structures étant liées.

24. Assemblage chimique selon la revendication 23, dans lequel au moins une des structures chimiques est une des structures chimiques définies dans les  
20 revendications 15 à 22.

25. Procédé de fabrication d'une structure chimique définie dans l'une quelconque des revendications 11 à 22 précédentes, caractérisé en ce  
25 qu'il comprend les étapes de préparation d'un cDNA comprenant une séquence de base codant pour ladite structure chimique, d'insertion du cDNA dans un vecteur d'expression approprié, de transformation d'une cellule hôte appropriée pour une répllication du plasmide et la  
30 fabrication de ladite structure par traduction dudit cDNA.

26. Procédé selon la revendication 25, dans lequel le vecteur est un plasmide.

27. Procédé selon la revendication 25, dans lequel  
5 le vecteur est le vecteur pGEX-2T.

28. Procédé selon la revendication 25, 26 ou 27, dans lequel la cellule hôte appropriée est *E. Coli*.

10 29. Utilisation d'une structure chimique telle que définie dans les revendications 1 à 22 pour préparer un médicament.

15 30. Utilisation d'un assemblage chimique tel que défini dans la revendication 23 ou 24 pour préparer un médicament.

20 31. Utilisation selon la revendication 29 ou 30, dans laquelle le médicament est choisi parmi un médicament destiné au traitement d'une thrombose, un médicament destiné au traitement d'une tumeur, un médicament ayant une action anti-inflammatoire.

25 32. Utilisation d'une structure telle que définie dans les revendications 1 à 21 pour la fabrication d'un matériau de recouvrement d'un biomatériau thrombogène.

30 33. Composé de marquage caractérisé en ce qu'il comprend une structure telle que définie dans les revendications 1 à 22 couplée à une molécule de marquage.

34. Composé de marquage caractérisé en ce qu'il comprend un assemblage tel que défini dans la revendication 23 ou 24 couplé à une molécule de marquage.

5

35. Composé selon la revendication 33 ou 34 dans lequel la molécule de marquage est choisie parmi une molécule fluorescente, le complexe avidine-biotine, un radioélément, et un composé paramagnétique.

10

36. Trousse de diagnostic comprenant un composé selon l'une quelconque des revendications 33 à 35.

37. Trousse de diagnostic selon la revendication 36, comprenant en outre un réactif adéquat permettant de détecter ladite molécule de marquage.

38. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 couplée à un marqueur.

39. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend un assemblage selon la revendication 23 ou 24 couplé à un marqueur.

40. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 couplée à un marqueur.

41. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend un assemblage selon la revendication 23 ou 24 couplé à un marqueur.





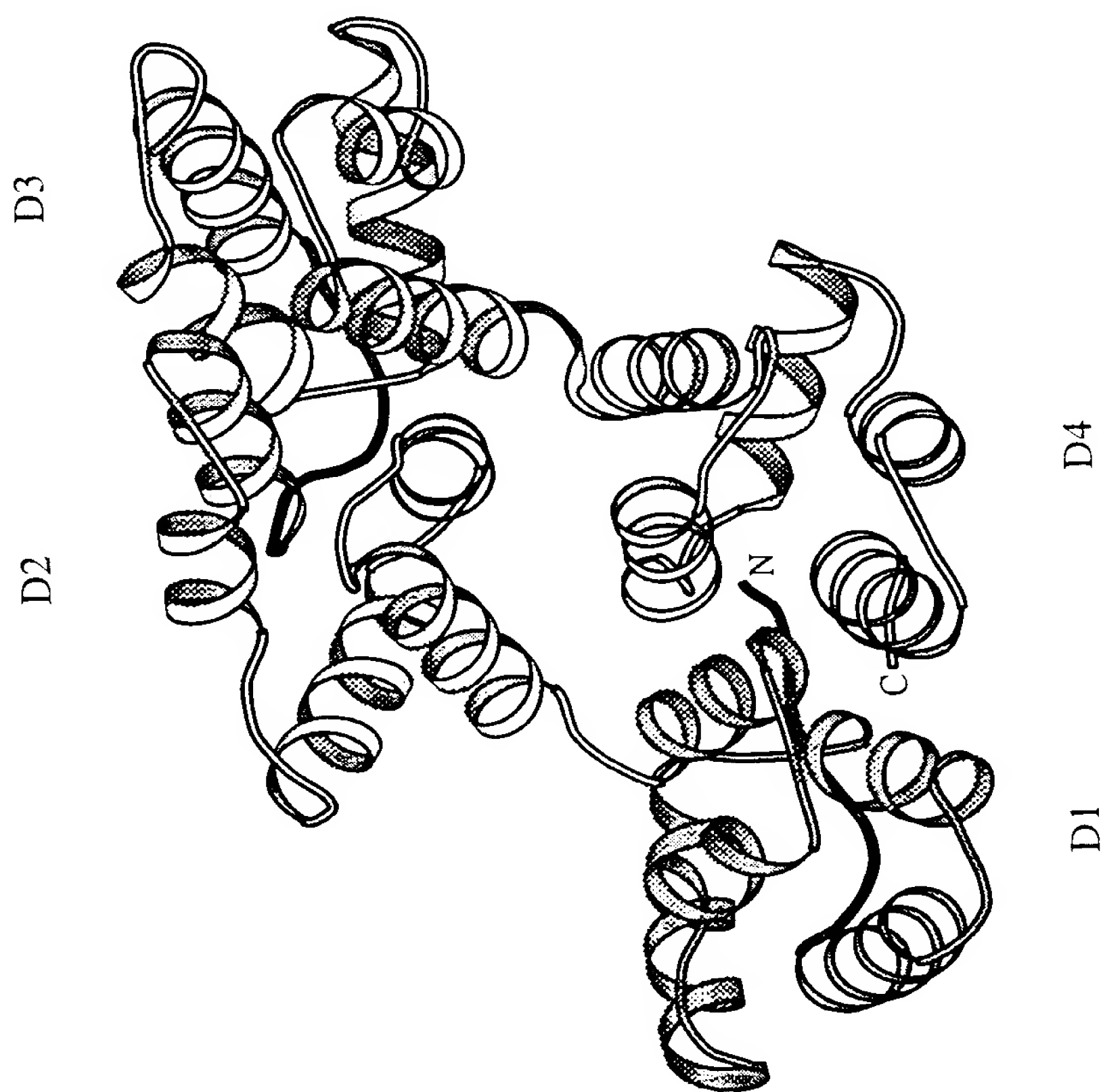


FIG. 1A

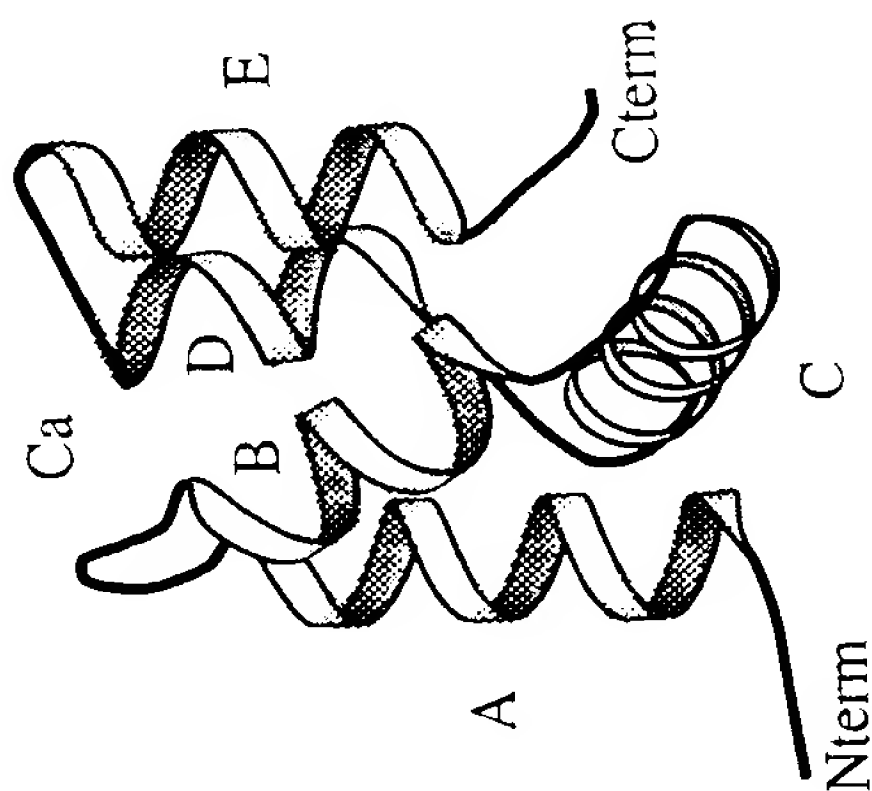


FIG. 1B



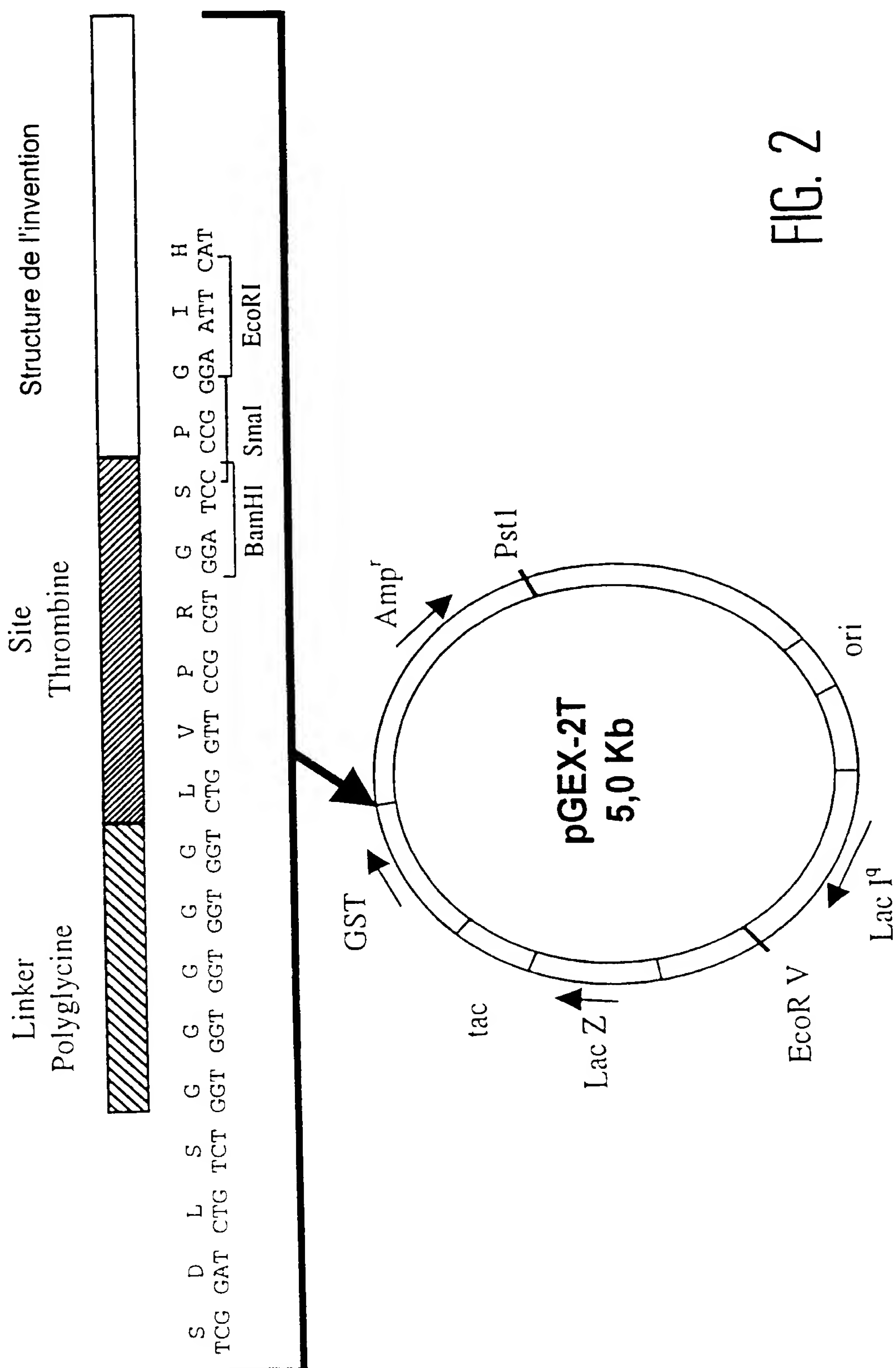


FIG. 2



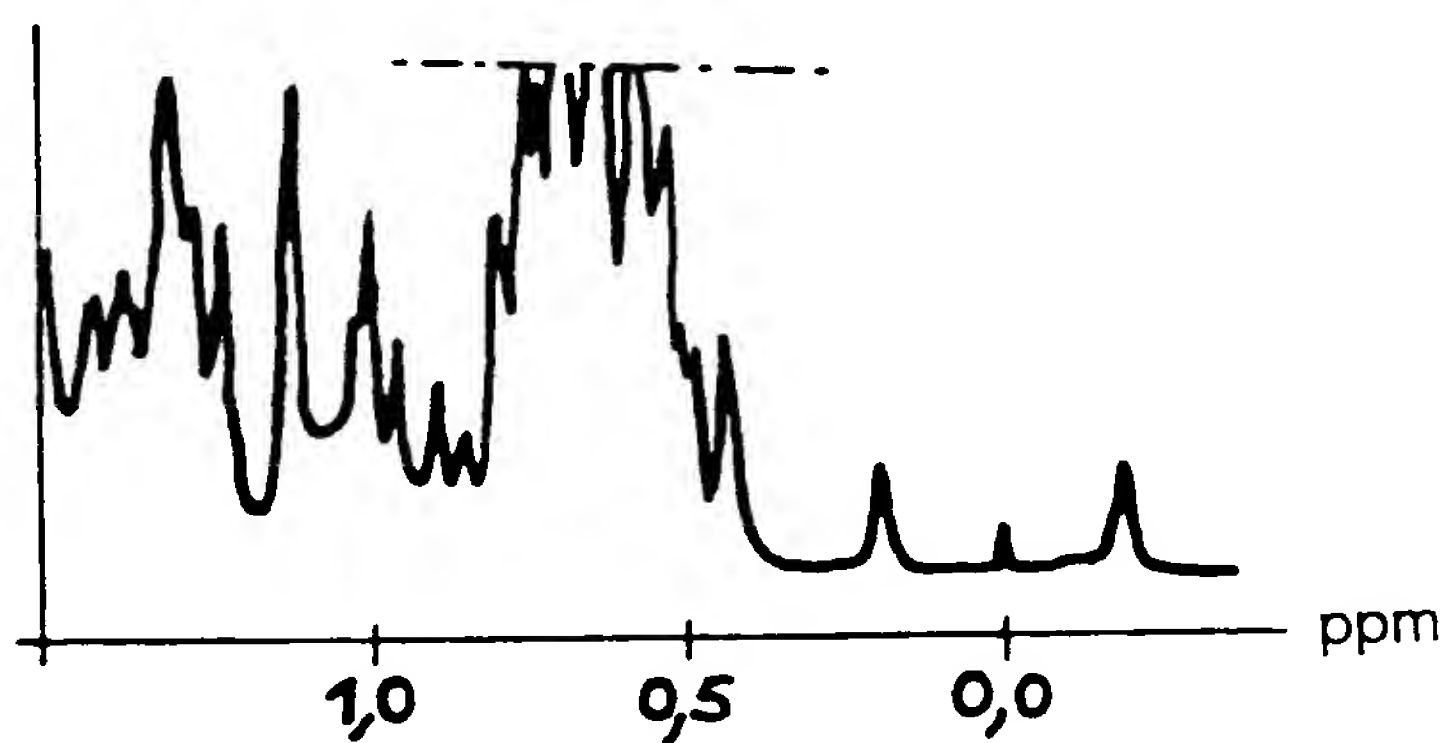


FIG. 3

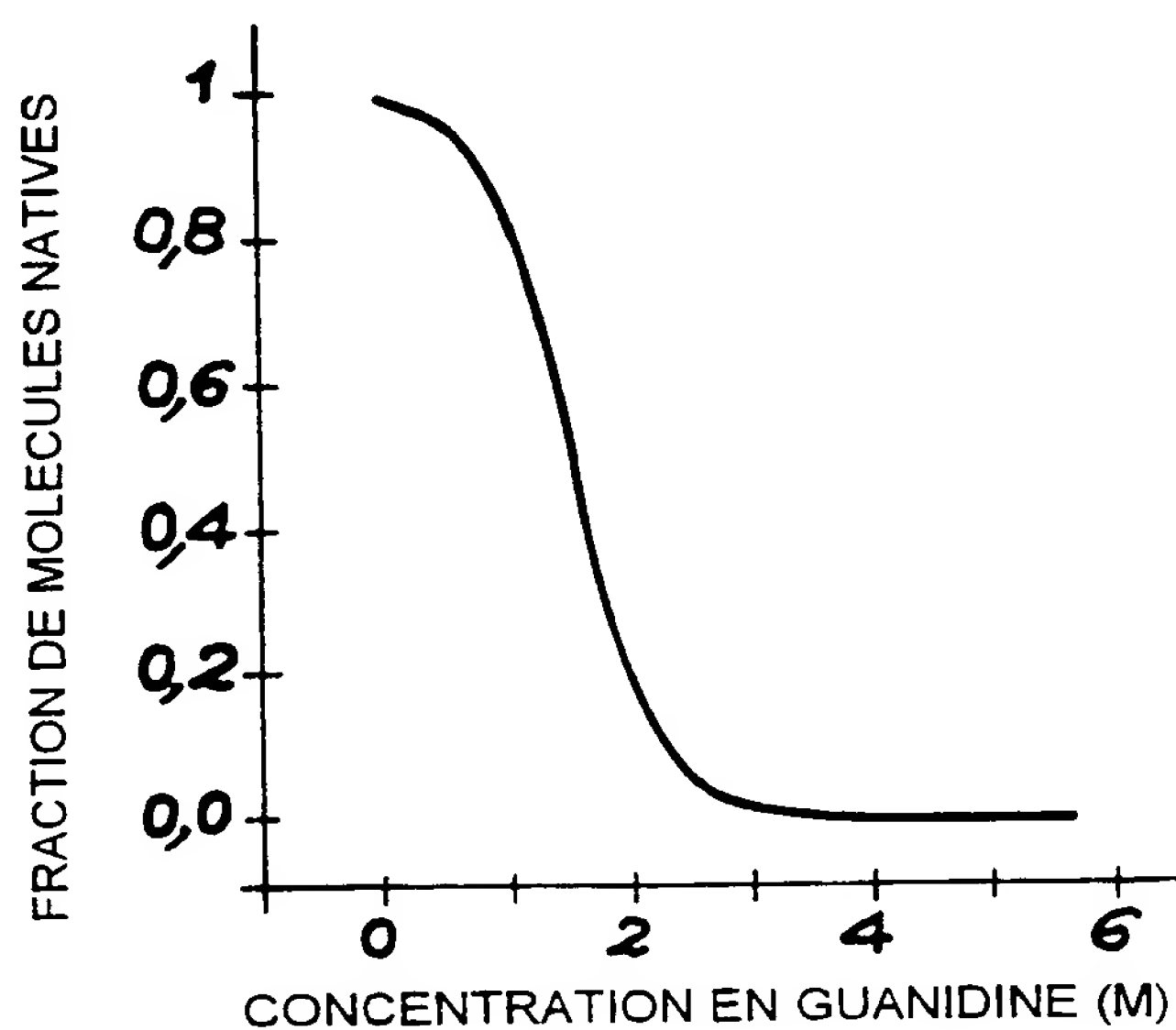


FIG. 4

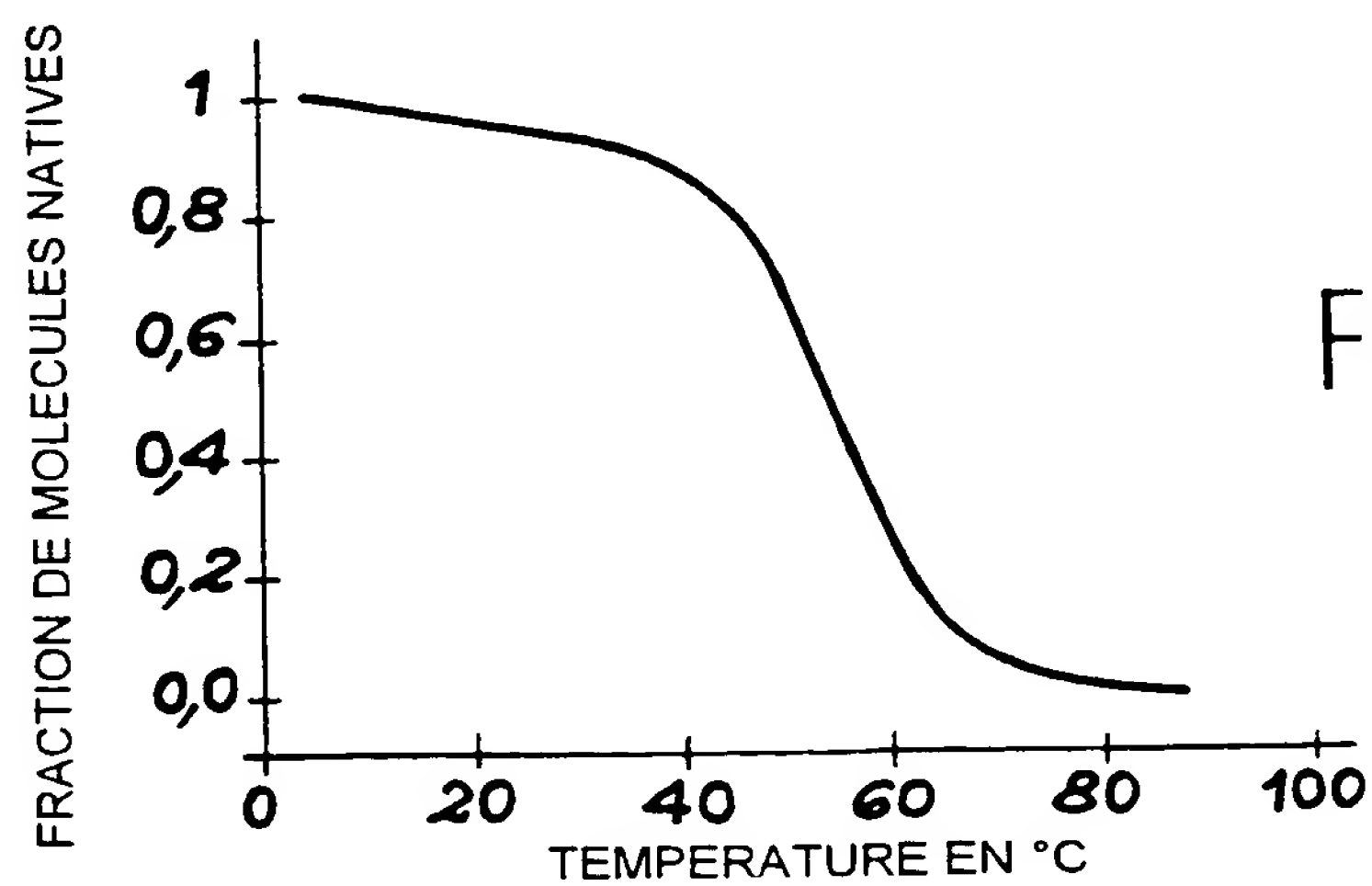


FIG. 5



## Séquence ID n°1

Domaine 2	Met	Ala	Met	Val	Ser	Glu	Phe	Leu	Lys	Gln	Ala	Trp	Phe	Ile
	1				5					10				
	Glu	Asn	Glu	Glu	Gln	Glu	Tyr	Val	Gln	Thr	Val	Lys	Ser	Ser
	15				20					25				
	Lys	Gly	Gly	Pro	Gly	Ser	Ala	Val	Ser	Pro	Tyr	Pro	Thr	Phe
	30				35					40				
	Asn	Pro	Ser	Ser	Asp	Val	Ala	Ala	Leu	His	Lys	Ala	Ile	Met
	45				50					55				
	Val	Lys	Gly	Val	Asp	Glu	Ala	Thr	Ile	Ile	Asp	Ile	Leu	Thr
	60				65					70				
	Lys	Arg	Asn	Asn	Ala	Gln	Arg	Gln	Gln	Ile	Lys	Ala	Ala	Tyr
	75				80									
	Leu	Gln	Glu	Thr	Gly	Lys	Pro	Leu	Asp	Glu	Thr	Leu	Lys	Lys
	85				90					95				
	Ala	Leu	Thr	Gly	His	Leu	Glu	Glu	Val	Val	Leu	Ala	Leu	Leu
	100				105					110				
	Lys	Thr	Pro	Ala	Gln	Phe	Asp	Ala	Asp	Glu	Leu	Arg	Ala	Ala
	115				120					125				
	Met	Lys	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Glu	Asp	Thr	Leu	Ile	Glu	Ile
	130				135					140				
	Leu	Ala	Ser	Arg	Thr	Asn	Lys	Glu	Ile	Arg	Asp	Ile	Asn	Arg
	145				150									
	Val	Tyr	Arg	Glu	Glu	Leu	Lys	Arg	Asp	Leu	Ala	Lys	Asp	Ile
	155				160					165				
	Thr	Ser	Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Phe	Arg	Asn	Ala	Leu	Leu	Ser
	170				175					180				
	Leu	Ala	Lys	Gly	Asp	Arg	Ser	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Asn	Glu
	185				190					200				
	Asp	Leu	Ala	Asp	Ser	Asp	Ala	Arg	Ala	Leu	Tyr	Glu	Ala	Gly
	205				210					215				
	Glu	Arg	Arg	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Asn	Val	Phe	Asn	Thr	Ile
	220				225									
	Leu	Thr	Thr	Arg	Ser	Tyr	Pro	Gln	Leu	Arg	Arg	Val	Phe	Gln
	230				235					240				
	Lys	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Ser	Lys	His	Asp	Met	Asn	Lys	Val	Leu
	245				250					260				
	Asp	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Asp	Ile	Glu	Lys	Cys	Leu	Thr	Ala
	265				270					275				
	Ile	Val	Lys	Cys	Ala	Thr	Ser	Lys	Pro	Ala	Phe	Phe	Ala	Glu
	280				285					290				
	Lys	Leu	His	Gln	Ala	Met	Lys	Gly	Val	Gly	Thr	Arg	His	Lys
	295				300									
	Ala	Leu	Ile	Arg	Ile	Met	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	Ile	Asp	Met
	305				310					315				
	Asn	Asp	Ile	Lys	Ala	Phe	Tyr	Gln	Lys	Met	Tyr	Gly	Ile	Ser
	320				325					330				
	Leu	Cys	Gln	Ala	Ile	Leu	Asp	Glu	Thr	Lys	Gly	Asp	Tyr	Glu
	335				340					345				
	Lys	Ile	Leu	Val	Ala	Leu	Cys	Gly	Gly	Asn				
	350				355									

FIG. 6A: Annexine I humaine





Séquence ID n°2

## Domaine 1

Met	Ala	Gln	Val	Leu	Arg	Gly	Thr	Val	Thr	Asp	Phe	Pro	Gly
1				5					10				
Phe	Asp	Glu	Arg	Ala	Asp	Ala	Glu	Thr	Leu	Arg	Lys	Ala	Met
15					20					25			
Lys	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Glu	Glu	Ser	Ile	Leu	Thr	Leu	Leu
	30					35					40		
Thr	Ser	Arg	Ser	Asn	Ala	Gln	Arg	Gln	Glu	Ile	Ser	Ala	Ala
	45					50						55	
Phe	Lys	Thr	Leu	Phe	Gly	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp	Asp	Leu	Lys
			60					65					70
Ser	Glu	Leu	Thr	Gly	Lys	Phe	Glu	Lys	Leu	Ile	Val	Ala	Leu
				75					75				
Met	Lys	Pro	Ser	Arg	Leu	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Glu	Leu	Lys	His
80					85					90			
Ala	Leu	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Glu	Lys	Val	Leu	Thr	Glu
	95					100					105		
Ile	Ile	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Ile	Lys
		110					115					120	
Gln	Val	Tyr	Glu	Glu	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp
			125					130					135
Val	Val	Gly	Asp	Thr	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Met	Leu	Val
				140					145				
Val	Leu	Leu	Gln	Ala	Asn	Arg	Asp	Pro	Asp	Ala	Gly	Ile	Asp
150					155					160			
Glu	Ala	Gln	Val	Glu	Gln	Asp	Ala	Gln	Ala	Leu	Phe	Gln	Ala
	165					170					175		
Gly	Glu	Leu	Lys	Trp	Gly	Thr	Asp	Glu	Glu	Lys	Phe	Ile	Thr
		180					185					190	
Ile	Phe	Gly	Thr	Arg	Ser	Val	Ser	His	Leu	Arg	Lys	Val	Phe
			195					200					205
Asp	Lys	Tyr	Met	Thr	Ile	Ser	Gly	Phe	Gln	Ile	Glu	Glu	Thr
				205					210				
Ile	Asp	Arg	Glu	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Leu
215					220					230			
Ala	Val	Val	Lys	Ser	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Ala	Tyr	Leu	Ala
	235					240					245		
Glu	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Asp
		250					255					260	
His	Thr	Leu	Ile	Arg	Val	Met	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	Ile	Asp
			265					270					275
Leu	Phe	Asn	Ile	Arg	Lys	Glu	Phe	Arg	Lys	Asn	Phe	Ala	Thr
				280					285				
Ser	Leu	Tyr	Ser	Met	Ile	Lys	Gly	Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Tyr
290					295					300			
Lys	Lys	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Glu	Asp	Asp		
	305						310				315		



## Séquence ID n°3

Domaine 2	Met	Ala	Ser	Ile	Trp	Val	Gly	His	Arg	Gly	Thr	Val	Arg	Asp
	1				5					10				
	Tyr	Pro	Asp	Phe	Ser	Pro	Ser	Val	Asp	Ala	Glu	Ala	Ile	Gln
	15				20					25				
	Lys	Ala	Ile	Arg	Gly	Ile	Gly	Thr	Asp	Glu	Lys	Met	Leu	Ile
		30					35					40		
	Ser	Ile	Leu	Thr	Glu	Arg	Ser	Asn	Ala	Gln	Arg	Gln	Leu	Ile
			45				50						55	
	Val	Lys	Glu	Tyr	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly	Lys	Glu	Leu	Lys	Asp
			60					65						70
	Asp	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu	Ser	Gly	His	Phe	Glu	His	Leu	Met
				75						80				
	Val	Ala	Leu	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Gln
	85					90					95			
	Leu	Lys	Lys	Ser	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Glu	Asp	Ala
		100					105					110		
	Leu	Ile	Glu	Ile	Leu	Thr	Thr	Arg	Thr	Ser	Arg	Gln	Met	Lys
			115					120					125	
	Asp	Ile	Ser	Gln	Ala	Tyr	Tyr	Thr	Val	Tyr	Lys	Lys	Ser	Leu
				130					135					140
	Gly	Asp	Asp	Ile	Ser	Ser	Glu	Thr	Ser	Gly	Asp	Phe	Arg	Lys
					145					150				
	Ala	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Asp	Glu	Ser	Leu
	155					160					165			
	Lys	Val	Asp	Glu	His	Leu	Ala	Lys	Gln	Asp	Ala	Gln	Ile	Leu
		170					175					180		
	Tyr	Lys	Ala	Gly	Glu	Asn	Arg	Trp	Gly	Thr	Asp	Glu	Asp	Lys
			185					190					195	
	Phe	Thr	Glu	Ile	Leu	Cys	Leu	Arg	Ser	Phe	Pro	Gln	Leu	Lys
				200					205					210
	Leu	Thr	Phe	Asp	Glu	Tyr	Arg	Asn	Ile	Ser	Gln	Lys	Asp	Ile
				215						220				
	Val	Asp	Ser	Ile	Lys	Gly	Glu	Leu	Ser	Gly	His	Phe	Glu	Asp
	225					230					235			
	Leu	Leu	Leu	Ala	Ile	Val	Asn	Cys	Val	Arg	Asn	Thr	Pro	Ala
		240					245					250		
	Phe	Leu	Ala	Glu	Arg	Leu	His	Arg	Ala	Leu	Lys	Gly	Ile	Gly
			255					260					270	
	Thr	Asp	Glu	Phe	Thr	Leu	Asn	Arg	Ile	Met	Val	Ser	Arg	Ser
				275					280					285
	Glu	Ile	Asp	Leu	Leu	Asp	Ile	Arg	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	His
				290						295				
	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Asp	Thr	Ser
	300					305					310			
	Gly	Asp	Tyr	Glu	Ile	Thr	Leu	Leu	Lys	Ile	Cys	Gly	Gly	Asp
		315					320					325		Asp

FIG. 6C : Annexine III humaine



## Séquence ID n°4

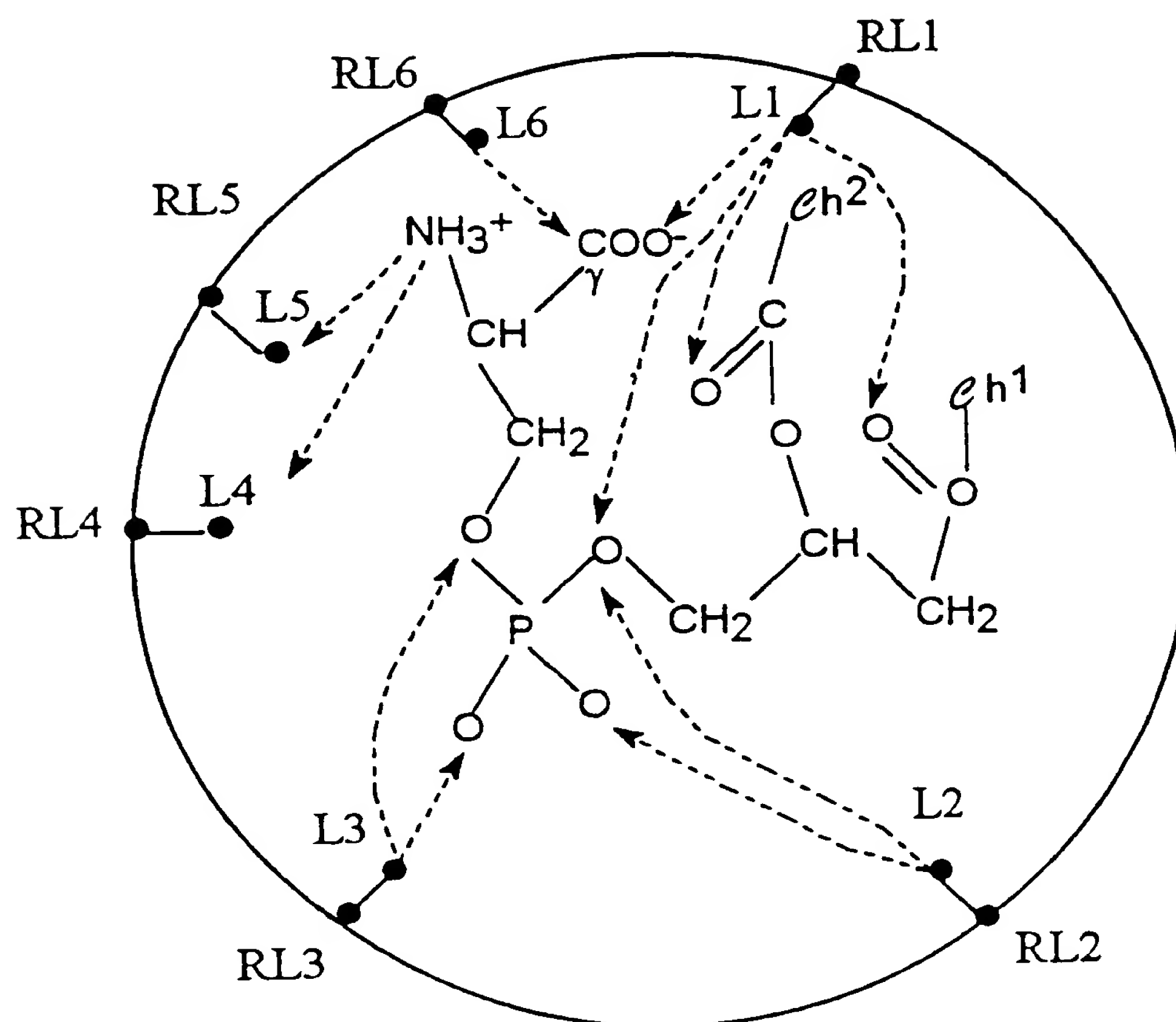
Domaine 1	Met	Ala	Thr	Lys	Gly	Gly	Thr	Val	Lys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
	1				5					10				
	Asn	Ala	Met	Glu	Asp	Ala	Gln	Thr	Leu	Arg	Lys	Ala	Met	Lys
	15				20					25				
	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Glu	Asp	Ala	Ile	Ile	Ser	Val	Leu	Ala
	30				35					40				
	Tyr	Arg	Asn	Thr	Ala	Gln	Arg	Gln	Glu	Ile	Arg	Thr	Ala	Tyr
	45				50					55				
	Lys	Ser	Thr	Ile	Gly	Arg	Asp	Leu	Ile	Asp	Asp	Leu	Lys	Ser
	60				65					70				
	Glu	Leu	Ser	Gly	Asn	Phe	Glu	Gln	Val	Ile	Val	Gly	Met	Met
					75				80					
	Thr													
	85													

## Séquence ID n°5

Domaine 2	Pro	Thr	Val	Leu	Tyr	Asp	Val	Gln	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	
	86					90					95			
	Ala	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Glu	Gly	Cys	Leu	Ile	Glu
	100					105					110			
	Ile	Leu	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Arg	Ile	Asn
	115					120					125			
	Gln	Thr	Tyr	Gln	Leu	Gln	Tyr	Gly	Arg	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp
	130					135					140			
	Ile	Arg	Ser	Asp	Thr	Ser	Phe	Met	Phe	Gln	Arg	Val	Leu	Val
	145					150								
	Ser	Leu	Ser	Ala	Gly	Gly	Arg	Asp	Glu	Gly	Asn	Tyr	Leu	Asp
	155				160					170				
	Asp	Ala	Leu	Val	Arg	Gln	Asp	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Glu	Ala
	175					180					185			
	Gly	Glu	Lys	Lys	Trp	Gly	Thr	Asp	Glu	Val	Lys	Phe	Leu	Thr
	190					195					200			
	Val	Leu	Cys	Ser	Arg	Asn	Arg	Asn	His	Leu	Leu	His	Val	Phe
	205					210					215			
	Asp	Glu	Tyr	Lys	Arg	Ile	Ser	Gln	Lys	Asp	Ile	Glu	Gln	Ser
	220				225									
	Ile	Lys	Ser	Glu	Thr	Ser	Gly	Ser	Phe	Glu	Asp	Ala	Leu	Leu
	230				235					240				
	Ala	Ile	Val	Lys	Cys	Met	Arg	Asn	Lys	Ser	Ala	Tyr	Phe	Ala
	245				250					255				
	Glu	Lys	Leu	Tyr	Lys	Ser	Met	Lys	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Asp
	260				265					270				
	Asn	Thr	Leu	Ile	Arg	Val	Met	Val	Ser	Arg	Ala	Glu	Ile	Asp
	275				280					285				
	Met	Leu	Asp	Ile	Arg	Ala	His	Phe	Lys	Arg	Leu	Tyr	Gly	Lys
	290				295									
	Ser	Leu	Tyr	Ser	Phe	Ile	Lys	Gly	Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Tyr
	300				305					310				
	Arg	Lys	Val	Leu	Leu	Val	Leu	Cys	Gly	Gly	Asp	Asp		
	315				320					325				

FIG. 6D: Annexine IV humaine





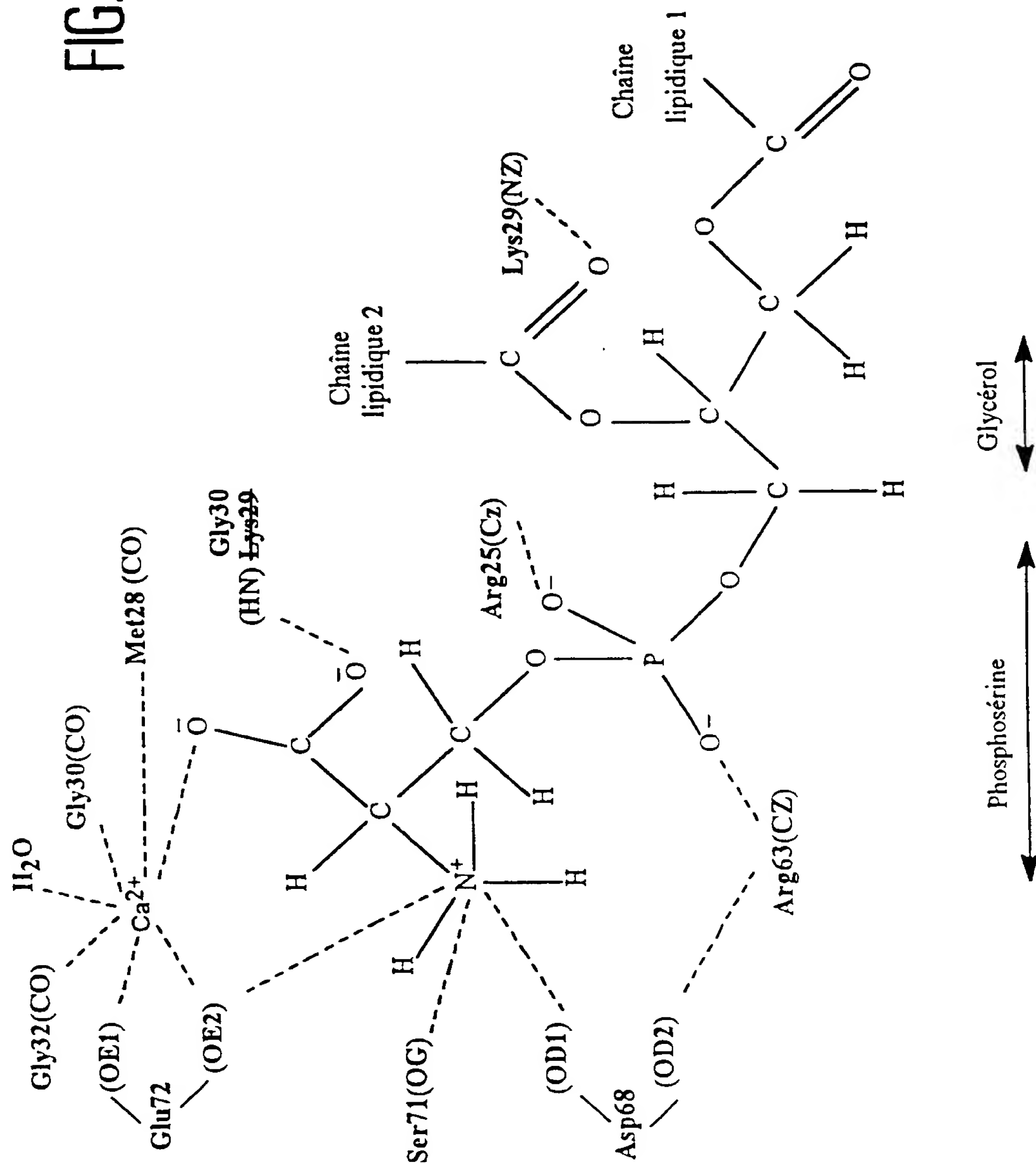
Composé (I) + phosphatidylsérine

FIG. 7





FIG. 8





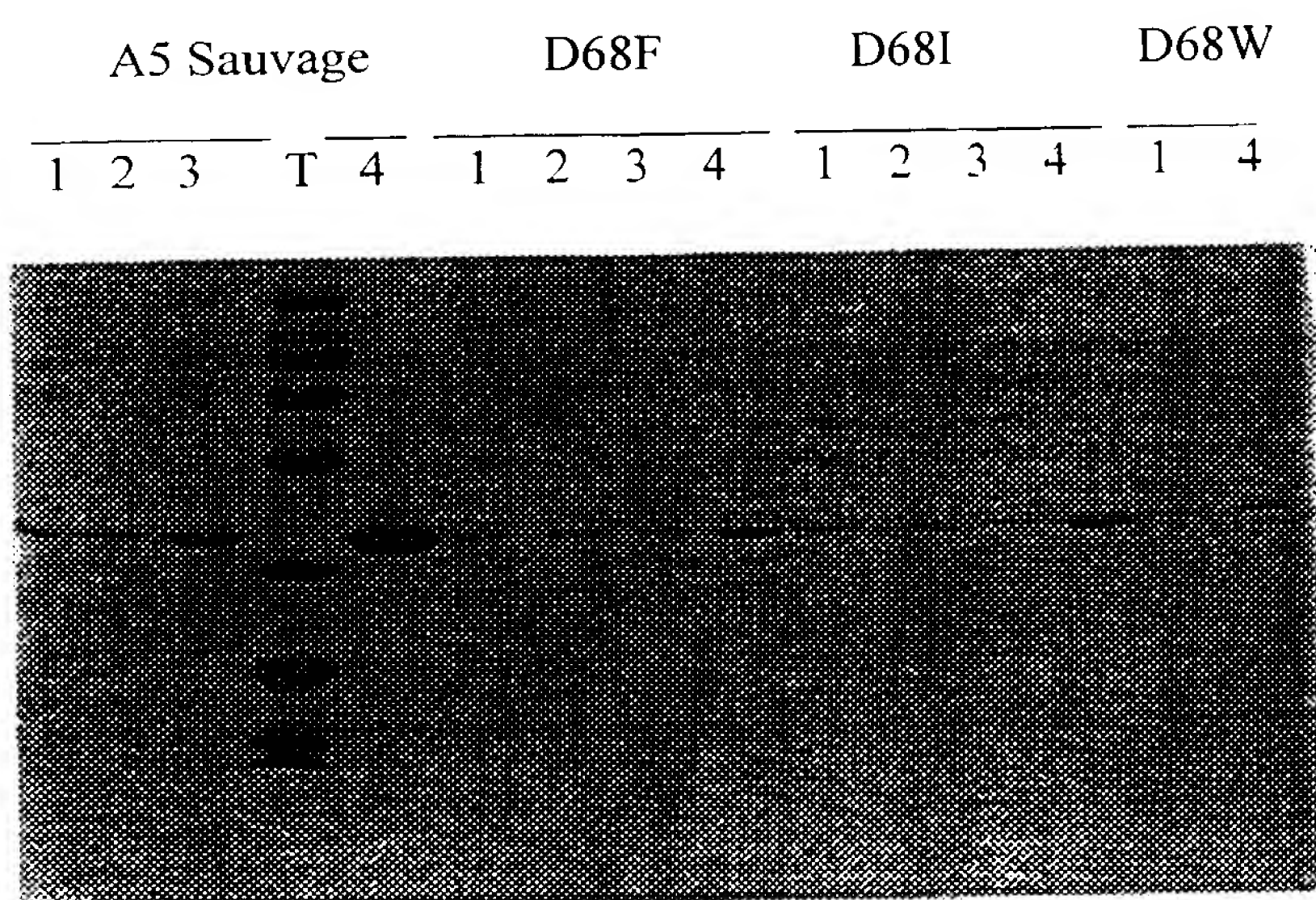


FIG. 9 A

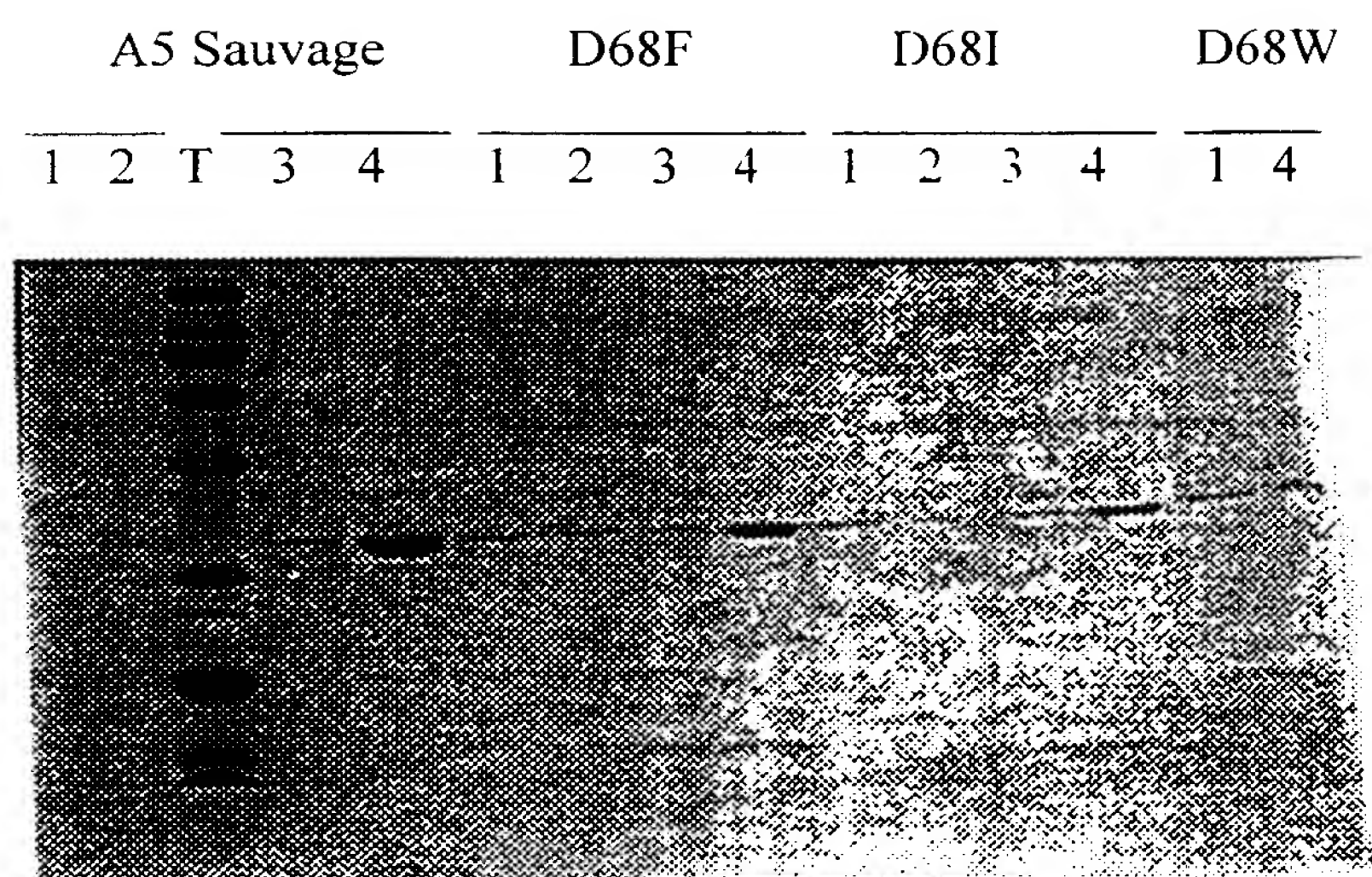


FIG. 9 B

